Capítulo

1

VALTER T. MOTTA

BIOQUÍMICA BÁSICA

Introdução à bioquímica

1

Introdução à Bioquímica

Objetivos

1 Relacionar a importância da água a suas propriedades físicas e químicas.

2 Definir pH, pK, tampão e seu significado biológico.

3 Descrever as propriedades biologicamente importantes do carbono.

4 Descrever a estrutura tridimensional das moléculas biológicas.

5 Descrever as macromoléculas como polímeros de pequenas moléculas.

6 Descrever as moléculas híbridas como conjugados de diferentes classes de moléculas biológicas.

7 Diferenciar as células procarióticas das células eucarióticas

A *bioquímica* estuda as estruturas moleculares, os mecanismos e os processos químicos responsáveis pela vida. Os organismos vivos continuamente efetuam atividades que permitem a sua sobrevivência, crescimento e reprodução. Para realizar as suas funções, os seres vivos dependem da capacidade de obter, transformar, armazenar e utilizar energia. Sem energia ocorre a perda da vitalidade e a morte celular. A maioria dos constituintes moleculares apresenta formas tridimensionais que executam inúmeras reações químicas entre si para manter e perpetuar a vida. Em bioquímica, a *estrutura,* a *organização* e as *atividades potenciais* dessas moléculas são examinadas na tentativa de elucidar que aspectos promovem as indispensáveis contribuições à manutenção da vida.

Os organismos vivos são estruturalmente complexos e diversificados. Todavia, muitas características são comuns a todos eles. Todos fazem uso das mesmas espécies de moléculas e extraem a energia do meio ambiente para as suas funções. Quando as moléculas que compõem os seres vivos são isoladas, estão sujeitas a todas as leis da química e da física que regem o universo não vivo.

Apesar da grande diversidade dos processos bioquímicos que envolvem a integração funcional de milhões de moléculas para manter e perpetuar a vida, a ordem biológica é conservada por vários processos: (1) síntese de biomoléculas, (2) transporte de íons e moléculas através das membranas biológicas, (3) produção de energia e movimento e (4) remoção de produtos metabólicos de excreção e substâncias tóxicas.

A quase totalidade das reações químicas que ocorre nos seres vivos são catalisadas por enzimas – proteínas com funções catalíticas. As reações celulares, conhecidas coletivamente como metabolismo, resultam de atividades altamente coordenadas. Os tipos mais comuns de reações encontradas nos processos bioquímicos são: (1) substituição nucleófila, (2) eliminação, (3) adição, (4) isomerização e (5) oxidação e redução.

Os seres vivos são formados por uma grande variedade de moléculas, tais como: carboidratos, lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos e compostos relacionados. Além dessas, outras substâncias estão presentes em pequenas quantidades: vitaminas, sais minerais, hormônios, etc. Muitos desses compostos se caracterizam por um ou mais grupos ácidos ou básicos em suas moléculas e ocorrem em solução aquosa como espécies ionizadas. A ionização tem lugar em água, sendo este um pré-requisito para muitas reações bioquímicas. O grau de dissociação ou a extensão da ionização de um grupo químico em particular e, portanto, a reatividade bioquímica da molécula, é amplamente influenciada pela concentração do íon hidrogênio da solução. Isto é aplicável tanto para as vias metabólicas, como também para os catalisadores biológicos (enzimas), que controlam as reações celulares.

1.2 Água: o meio da vida

A água compõe a maior parte da massa corporal do ser humano. É o solvente biológico ideal. A capacidade solvente inclui íons (ex.: Na^+, K^+ e Cl^-), açúcares e muitos aminoácidos. Sua incapacidade para dissolver algumas substâncias como lipídeos e alguns aminoácidos, permite a formação de estruturas supramoleculares (ex.: membranas) e numerosos processos bioquímicos (ex.: dobramento protéico). Nela estão dissolvidas ou suspensas as moléculas e partículas necessárias para o bom funcionamento celular. Reagentes e produtos de reações metabólicas, nutrientes, assim como produtos de excreção, dependem da água para o transporte no interior das células e entre as células.

As interações fracas são os meios pelos quais as moléculas interagem entre si – enzimas com seus substratos, hormônios com seus receptores, anticorpos com seus antígenos. A força e a especificidade das interações fracas são grandemente dependentes do meio onde ocorrem, sendo que a maioria das interações biológicas tem lugar na água. Duas propriedades da água são especialmente importantes para a existência dos seres vivos:

- *A água é uma molécula polar.* A molécula de água é não-linear com distribuição da carga de forma assimétrica.
- *A água é altamente coesiva.* As moléculas de água interagem entre si por meio de pontes de hidrogênio. A natureza altamente coesiva da água afeta as interações entre as moléculas em solução aquosa.

A. Estrutura da água

A água é uma molécula dipolar formada por dois átomos de hidrogênio ligados a um átomo de oxigênio. Cada átomo de

hidrogênio possui uma carga elétrica parcial positiva (δ^+) e o átomo de oxigênio, carga elétrica parcial negativa (δ^-). Assim, o compartilhamento dos elétrons entre H e O é desigual, o que acarreta o surgimento de dois dipólos elétricos na molécula de água; um para cada ligação H−O. O ângulo de ligação entre os hidrogênios e o oxigênio (H−O−H) é 104,3°, tornando a molécula eletricamente assimétrica e produzindo dipólos elétricos (Figura 1.1). Ao se aproximarem, as moléculas de água interagem, pois a carga elétrica parcial positiva do hidrogênio de uma molécula atrai a carga elétrica parcial negativa do oxigênio de outra molécula de água adjacente, resultando em uma atração eletrostática denominada *ponte de hidrogênio*. Quatro moléculas de água podem interagir produzindo uma estrutura quase tetraédrica estabilizada por pontes de hidrogênio (Figura 1.1).

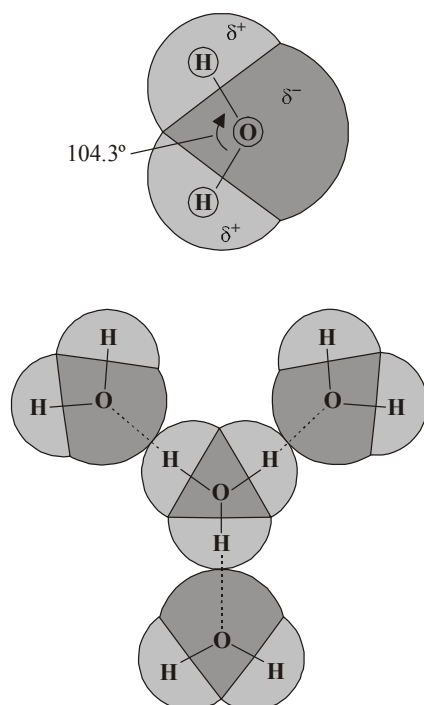



Figura 1.1
Estrutura da molécula de água. O ângulo de ligação H-O-H é 104,3° e tanto os hidrogênios como o oxigênio possuem cargas elétricas parciais criando um dipolo elétrico. A parte inferior da figura mostra quatro moléculas de água interagindo para formar uma estrutura estabilizada por pontes de hidrogênio.

B. Interações não-covalentes

As interações não-covalentes são geralmente eletrostáticas; elas ocorrem entre o núcleo positivo de um átomo e a nuvem eletrônica de outro átomo adjacente. De modo diferente das ligações covalentes, as interações não-covalentes são individualmente fracas e facilmente rompidas (Tabela 1.1). No entanto, coletivamente elas influenciam de modo significativo as propriedades químicas e físicas da água e as estruturas, propriedades e funções das biomoléculas (proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos e lipídeos) pelo efeito cumulativo de muitas interações. O grande número de interações não–covalentes estabiliza macromoléculas e estruturas supramoleculares, de tal modo que essas ligações sejam rapidamente formadas ou rompidas permitindo a flexibilidade necessária para manter os processos dinâmicos da vida. Nos organismos vivos, as interações não-

covalentes mais importantes são: pontes de hidrogênio, interações iônicas, interações hidrofóbicas e interações de van der Waals.

Tabela 1.1 – Energia de dissociação de ligação (energia necessária para romper a ligação) de ligações encontradas nos seres vivos

Tipo de ligação	Energia de dissociação de ligação ($kJ \cdot mol^{-1}$)
Ligações covalentes	>210
Ligações não–covalentes	
Interações eletrostáticas (ligações iônicas)	4–80
Pontes de hidrogênio	12–30
Interações hidrofóbicas	3–12
Forças de Van der Waals	0,3–9

C. Propriedades solventes da água

A natureza polar e a capacidade de formar pontes de hidrogênio, torna a água uma molécula com grande poder de interação. A água solvata facilmente as moléculas polares ou iônicas pelo enfraquecimento das interações eletrostáticas e das pontes de hidrogênio entre as moléculas competindo com elas por suas atrações (efeito hidrofílico, do grego "que gosta de água").

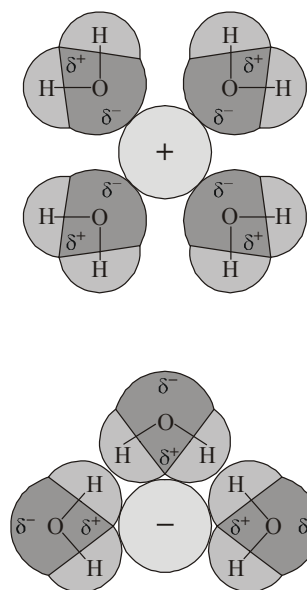



Figura 1.2
Solvatação de íons. A carga do íon orienta os dipolos das moléculas da água.

A água dissolve sais como o NaCl por hidratação e estabilização dos íons Na^+ e Cl^-, enfraquecendo as interações eletrostáticas, e assim impedindo a associação para formar uma rede cristalina.

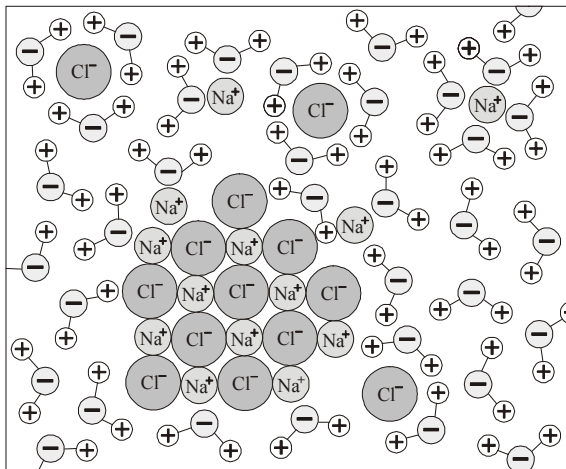



Figura 1.3
Dissolução de sais cristalinos. A água dissolve o NaCl (e outros sais cristalinos) por meio da hidratação dos íons Na^+ e Cl^-. À medida que as moléculas de água se agrupam ao redor dos íons Cl^- e Na^+ a atração eletrostática necessária para a formação da rede cristalina de NaCl é rompida.

A água dissolve biomoléculas com grupos ionizáveis e muitas com grupos funcionais polares, porém não−carregadas, por formar pontes de hidrogênio com os solutos. Essas associações são formadas entre a água e os grupos carbonila, aldeídico, cetônico e hidroxila dos álcoois.

As biomoléculas ou grupamentos não-polares são insolúveis em água, pois as interações entre as moléculas de água são mais fortes que as interações da água com compostos não−polares. Os compostos não−polares tendem a se aglomerar em água (efeito hidrofóbico, do grego "que teme a água"). As interações hidrofóbicas são as principais forças propulsoras no enovelamento de macromoléculas (exemplo, proteínas).

D. Moléculas anfifílicas

Um grande número de biomoléculas, denominadas *anfifílicas* (ou *anfipáticas*), contêm tanto grupos polares como grupos não-polares. Essa propriedade afeta significativamente o meio aquoso. Por exemplo, os ácidos graxos ionizados são moléculas anfipáticas porque contêm grupos carboxilatos hidrofílicos e grupos hidrocarbonetos hidrofóbicos. Quando misturados com a água, as moléculas anfifílicas se agregam formando estruturas estáveis chamadas *micelas.* Nas micelas, as regiões carregadas (grupos carboxilatos), denominadas *cabeças polares,* são orientadas para a água com a qual interage. A *cauda hidrocarboneto* não-polar tende a evitar o contato com a água e orienta-se para o interior hidrofóbico. A tendência das biomoléculas anfipáticas é espontaneamente se rearranjar em água e é uma característica importante de numerosos componentes celulares. Por exemplo, a formação de bicamadas por moléculas de fosfolipídeos é a estrutura básica das membranas biológicas (Figura 1.4).

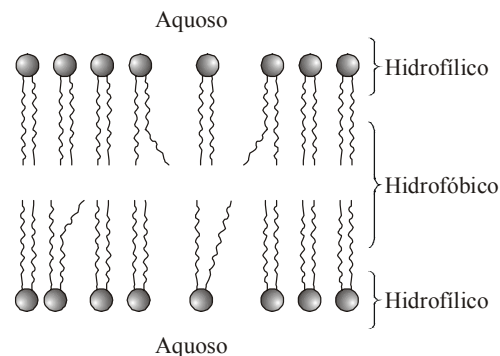



Figura 1.4
Bicamada lipídica. Formada na água por moléculas anfifílicas (fosfolipídeos) com cabeças polares e caudas sinuosas.

E. Pressão osmótica

Osmose é o processo espontâneo no qual as moléculas solventes atravessam uma membrana semipermeável de uma solução de menor concentração de soluto para uma solução de maior concentração de soluto. Poros na membrana são suficientemente amplos para permitir que as moléculas solventes atravessem nas duas direções mas muito estreitos para a passagem de grandes moléculas de soluto ou íons. A *pressão osmótica* é a pressão necessária para interromper o fluxo líquido de água por meio da membrana. A pressão osmótica depende da concentração do soluto.

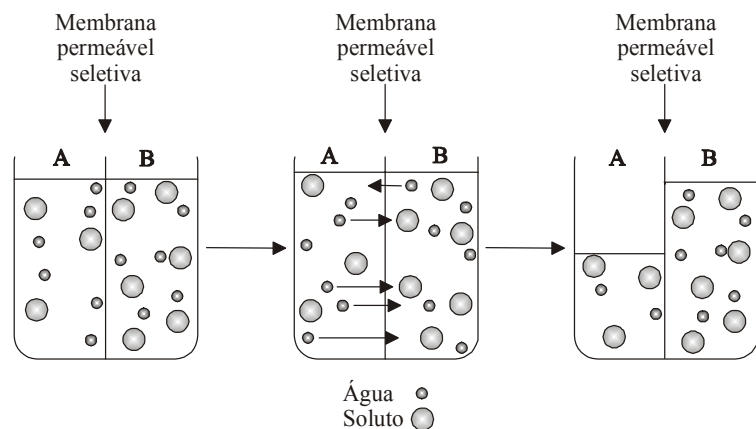



Figura 1.5
Pressão osmótica. A água difunde do lado A (mais diluído) para o lado B (mais concentrado). O equilíbrio entre as soluções nos dois lados da membrana semipermeável é atingido quando não houver mais movimento de moléculas de água do lado A para o lado B. A pressão osmótica interrompe o fluxo de água por meio da membrana.

A pressão osmótica cria alguns problemas críticos para os organismos vivos. As células contêm altas concentrações de alguns solutos, que são pequenas moléculas orgânicas e sais iônicos, também como, macromoléculas em baixas concentrações. Conseqüentemente, as células podem ganhar ou perder água devido a concentração de

soluto em relação ao seu meio. Se as células estão em *solução isotônica* (a concentração de soluto e água é a mesma nos dois lados da membrana plasmática seletivamente permeável) e a célula nem ganha nem perde água. Por exemplo, os eritrócitos são isotônicos em solução de NaCl a 0,9%. Quando as células são colocadas em uma solução com concentração baixa de soluto (*solução hipotônica*) a água se move para o interior das células. Os eritrócitos, por exemplo, se distendem e se rompem em processo chamado *hemólise* quando eles são imersos em água pura. Nas soluções hipertônicas, aquelas com maior concentrações de soluto, as células murcham à medida que a água flui para a solução. Por exemplo, em solução hipertônica de NaCl a 3%, os eritrócitos murcham e tornem-se *crenados*.

Um aumento da osmolaridade no plasma, desencadeia rapidamente a sede, exigindo a ingestão de água para diluir o Na^+ e reajustar a osmolaridade para baixo.

F. Ionização da água

Pequena proporção de moléculas de água se dissociam para formar íons hidrogênio (H^+) e hidroxila (OH^-):

$$H_2O \leftrightarrows H^+ + OH^-$$

Para cada mol de H^+ , um mol de OH^- é produzido. Devido a elevada reatividade do íon hidrogênio (ou próton) e o momento dipolar da molécula de água, o H^+ não existe como tal em solução aquosa, mas reage com uma segunda molécula de H_2O para formar o *íon hidrônio* (H_3O^+). O grau de ionização é descrito quantitativamente pela *constante de dissociação* (K):

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

O valor da K para a água é 1,8 x 10^{-16} a 25°C. A concentração da água não dissociada pode ser considerada como uma constante (1000 g/18 g/mol = 55,5 M; ou seja, o número de gramas de água em 1000 mL dividido pela molécula-grama da água). Portanto, a quantidade ionizada de água é insignificante em relação a não ionizada. Substituindo os valores na equação anterior, tem-se:

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{55,5} = 1,8 \times 10^{-16}$$

Desse modo, uma nova constante para a dissociação da água pode ser definida, K_w, a *constante do produto iônico da água*:

$$K_w = K_{eq} \times 55,5 = [H^+][OH^-]$$

$$K_w = (1,8 \times 10^{-16})(55,5) = 1,0 \times 10^{-14}$$

Assim, a 25 °C o valor de K_w é dado por:

$$K_w = [H^+][OH^-] = (10^{-7})(10^{-7}) = 10^{-14}$$

Portanto, o valor numérico do produto $[H^+][OH^-]$ em soluções aquosas a 25°C é sempre 1,0 x 10^{-14}. Em água pura $[H^+] = [OH^-]$

tem o valor 1,0 x 10^{-7} M. Sempre existe equilíbrio entre H_2O, H^+ e OH^- em soluções diluídas, independentemente da presença de substâncias dissolvidas. Ao adicionar qualquer substância, como ocorre na adição de um ácido ou uma base, alterações concomitantes devem ocorrer nas concentrações do H^+ ou OH^-, para satisfazer à relação de equilíbrio. Conhecendo-se a concentração de um deles, facilmente é calculado o teor do outro.

G. Escala de pH

Para evitar o uso de exponenciais para expressar as concentrações dos íons hidrogênio em soluções emprega-se a escala de pH, um modo conveniente para expressar a concentração real de íons hidrogênio de uma solução. O pH de uma solução é definido como o logaritmo negativo base 10 da concentração de íons hidrogênio:

$$pH = -\log[H^+]$$

Em uma solução aquosa neutra a 25°C, a concentração do íon hidrogênio (como também a $[OH^-]$) é 1,0 x 10^{-7} M ou pH = 7,0:

$$[H^+] = 0{,}000.000.1\ M = 1{,}0 \times 10^{-7}\ M$$

$$\log [H^+] = -7$$

$$pH = -\log[H^+] = 7$$

Soluções com pH menor do que 7 são *ácidas,* enquanto aquelas com pH>7 são *básicas*. A Tabela 1.2 mostra a relação entre a $[H^+]$, $[OH^-]$, pH e pOH.

Tabela 1.2 – Relação entre $[H^+]$, $[OH^-]$, pH e pOH.

$[H^+]$ (M)	pH	$[OH^-]$ (M)	pOH
1,0	0	1×10^{-14}	14
0,1(1×10^{-1})	1	1×10^{-13}	13
1×10^{-2}	2	1×10^{-12}	12
1×10^{-3}	3	1×10^{-11}	11
1×10^{-4}	4	1×10^{-10}	10
1×10^{-5}	5	1×10^{-9}	9
1×10^{-6}	6	1×10^{-8}	8
1×10^{-7}	7	1×10^{-7}	7
1×10^{-8}	8	1×10^{-6}	6
1×10^{-9}	9	1×10^{-5}	5
1×10^{-10}	10	1×10^{-4}	4
1×10^{-11}	11	1×10^{-3}	3
1×10^{-12}	12	1×10^{-2}	2
1×10^{-13}	13	0,1(1×10^{-1})	1
1×10^{-14}	14	1,0	0

É importante frisar que o pH varia na razão inversa da concentração de H^+. Desse modo, o aumento de $[H^+]$ reduz o pH enquanto a diminuição, o eleva. Notar também, que o pH é uma função logarítmica, portanto, quando o pH de uma solução aumenta de 3 para 4, a concentração de H^+ diminui 10 vezes de 10^{-3} M a 10^{-4} M.

Exercício 1.1

Como a água pura tem $[H^+] = 10^{-7}$ M, calcular o pH das seguintes soluções:

1. HCl 10^{-4} M
2. NaOH 10^{-5} M

A auto-ionização da água apresenta uma contribuição negligenciável para as concentrações de íons hidrônio e íons hidróxido.

Solução:

1. Para o HCl 10^{-4}: $[H_3O^+] = 10^{-4}$ M; portanto pH = 4.
2. Para o NaOH 10^{-5}: $[OH^-] = 10^{-5}$ M. Como $[OH^-][H_3O^+] = 1 \times 10^{-14}$, então, $[H_3O^+] = 10^{-9}$ M; assim, pH = 9

Os pH de diferentes líquidos biológicos são mostrados na Tabela 1.3. Em pH 7 o íon H^+ está na concentração 0,000.000.1 M (1×10^{-7}), enquanto a concentração de outros catíons estão entre 0,001 e 0,10 M. Um aumento no teor de íon H^+ de somente 0,000.001 (1×10^{-6}) tem um grande efeito deletério sobre as atividades celulares.

Tabela 1.3 – Valores de pH de alguns líquidos biológicos.

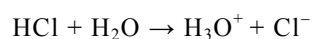
Líquido	pH
Plasma sangüíneo	7,4
Líquido intersticial	7,4
Líquido intracelular (citosol hepático)	6,9
Suco gástrico	1,5–3,0
Suco pancreático	7,8–8,0
Leite humano	7,4
Saliva	6,4–7,0
Urina	4,5–8,0

1.3 Ácidos e bases

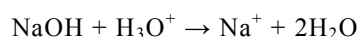
A concentração do íon hidrogênio, $[H^+]$, afeta a maioria dos processos nos sistemas biológicos. As definições de ácidos e bases propostas por Bronsted e Lowry são as mais convenientes no estudo das reações dos seres vivos:

- *Ácidos são substâncias que podem doar prótons.*
- *Bases são substâncias que podem aceitar prótons.*

Por exemplo, a adição de ácido clorídrico (HCl) a uma amostra de água aumenta a concentração de íon hidrogênio ($[H^+]$ ou $[H_3O^+]$) pois o HCl doa um próton para a água:

$$HCl + H_2O \rightarrow H_3O^+ + Cl^-$$

A H_2O atua como uma base que aceita um próton do ácido adicionado.

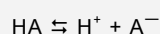
Do mesmo modo, a adição da base hidróxido de sódio (NaOH) aumenta o pH (redução da $[H^+]$) pela introdução de íons hidróxido que combinam com os íons hidrogênios existentes:

$$NaOH + H_3O^+ \rightarrow Na^+ + 2H_2O$$

Na reação, o H_3O^+ é o ácido que doa um próton para a base adicionada. O pH final da solução depende o quanto de H^+ (por exemplo, do HCl) foi adicionado ou quanto de H^+ foi removido da solução por sua reação com uma base (por exemplo, íon OH^- do NaOH).

Quadro 1.1 Força de ácidos

A *força de um ácido ou base* refere-se a eficiência com que o ácido doa prótons ou a base aceita prótons. Com respeito a força, existem duas classes de ácidos e bases: *fortes* e *fracos*. Ácidos e bases fortes são aqueles que se dissociam quase completamente em meio aquoso diluído (Ex.: HCl ou NaOH). Ácidos e bases fracos são os que dissociam parcialmente em soluções aquosas diluídas (Ex.: CH_3-COOH ou NH_3).

A tendência de um ácido fraco não-dissociado (HA) para perder um próton e formar a sua base conjugada (A^-) é dada pela equação:

$$HA \leftrightarrows H^+ + A^-$$

Esta reação não ocorre até o final, mas, atinge um ponto de *equilíbrio* entre 0 e 100% da reação.

No equilíbrio, a velocidade líquida é zero pois as velocidades absolutas em ambas as direções são exatamente iguais. Tal posição é descrita pela equação:

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

em que K é a *constante de equilíbrio* da reação reversível e tem um valor fixo para cada temperatura. As K para as reações de ionização são denominadas *constantes de dissociação* ou de *ionização*.

Para os ácidos é usada a designação K_a. Os ácidos fortes tem valor de K_a elevado, pois apresentam maior número de prótons liberados por mol de ácido em solução.

A. Pares ácido-base conjugados

Quando um ácido fraco, como o ácido acético, é dissolvido em água, obtém-se uma dissociação parcial, estabelecendo um equilíbrio entre o ácido, o acetato e o íon hidrogênio (próton):

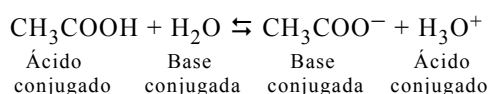
$$\underset{\text{Ácido conjugado}}{CH_3COOH} + \underset{\text{Base conjugada}}{H_2O} \leftrightarrows \underset{\text{Base conjugada}}{CH_3COO^-} + \underset{\text{Ácido conjugado}}{H_3O^+}$$

O ácido acético é um *ácido conjugado* (doador de prótons). A forma ionizada do ácido acético, o íon acetato (CH_3COO^-) é denominada *base conjugada* (aceptora de prótons) ou "sal". Em reações deste tipo, típicas de todos os equilíbrios ácido-base, o ácido fraco (CH_3COOH) e a base formada na sua dissociação (CH_3COO^-) constituem um *par ácido-base conjugado*.

Tabela 1.4 – Alguns pares ácido-base conjugados de importância nos sistemas biológicos.

Doador de prótons		Aceptor de prótons
$CH_3–CHOH–COOH$	$\leftrightarrows$	$H^+ + CH_3CHOHCOO^-$
$CH_3–CO–COOH$	$\leftrightarrows$	$H^+ + CH_3CO–COO^-$
$HOOC–CH_2–CH_2–COOH$	$\leftrightarrows$	$2H^+ + {}^-OOC–CH_2–CH_2–COO^-$
${}^+NH_3–CH_2–COOH$	$\leftrightarrows$	$H^+ + {}^+NH_3–CH_2–COO^-$

A constante de equilíbrio para a dissociação do ácido acético é:

$$K = \frac{[CH_3-COO^-][H_3O^+]}{[CH_3-COOH][H_2O]}$$

Como a concentração da água (55,5 M) é pouco alterada pela *constante de dissociação ácida,* K_a:

$$K_a = \frac{[CH_3-COO^-][H^+]}{[CH_3-COOH]}$$

O valor de K_a para o ácido acético é $1,74 \times 10^{-5}$.

A tendência de um ácido conjugado em dissociar é especificada pelo valor de K_a; em valores baixos, a tendência em liberar prótons é pequena (menos ácido se dissocia), em valores elevados é maior a tendência em liberar prótons (mais ácido se dissocia). As constantes de dissociação são mais facilmente expressas em termos de pK_a, que é definido como:

$$pK_a = -\log K_a$$

ou seja, o pK_a de um ácido é o logaritmo negativo da constante de dissociação do mesmo. Para o ácido acético,

$$pK_a = -\log (1,74 \times 10^{-5}) = 4,76$$

A relação entre pK_a e K_a é inversa; o menor valor de K_a fornece o maior pK_a. Os valores de K_a e pK_a de alguns ácidos são mostrados na Tabela 1.4. A água é considerada um ácido muito fraco com pK_a = 14 a 25°C.

Tabela 1.5 – Constantes de dissociação e pK_a de alguns ácidos fracos importantes em bioquímica (a 25°C).

Ácido	K_a, M	pK_a
Ácido acético (CH_3COOH)	$1,74 \times 10^{-5}$	4,76
Ácido láctico (CH_3–CHOH–COOH)	$1,38 \times 10^{-4}$	3,86
Ácido pirúvico (CH_3CO–COOH)	$3,16 \times 10^{-3}$	2,50
Glicose–6–PO_3H^-	$7,76 \times 10^{-7}$	6,11
Ácido fosfórico (H_3PO_4)	$1,1 \times 10^{-2}$	2,0
Íon diidrogenofosfato $(H_2PO_4^-)$	$2,0 \times 10^{-7}$	6,8
Íon hidrogenofosfato (HPO_4^{2-})	$3,4 \times 10^{-13}$	12,5
Ácido carbônico (H_2CO_3)	$1,70 \times 10^{-4}$	3,77
Íon amônio (NH_4^+)	$5,62 \times 10^{-10}$	9,25

B. Equação de Henderson-Hasselbalch

O pH de uma solução contendo uma mistura de ácido fraco com sua base conjugada pode ser calculado pela equação de Henderson-Hasselbach. Para a dissociação do ácido fraco ($HA \leftrightarrows H^+ + A^-$) a equação pode ser derivada tomando-se o logaritmo negativo dos dois lados da equação K_a:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Por rearranjo

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[H^-]}$$

Pode-se expressar $[H^+]$ como $-\log[H^+]$ e K_a como $-\log K_a$ e obter-se

$$-\log[H^+] = -\log K_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

e empregando as definições de pH e pK_a

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

ou escrita de forma genérica:

$$pH = pK_a' + \log_{10} \frac{[\text{Base conjugada}]}{[\text{Ácido conjugado}]}$$

Esta equação apresenta um modo conveniente para o estudo do inter-relacionamento do pH de uma solução, o pK_a do ácido fraco e as quantidades relativas de ácido conjugado e base conjugada presentes. Nos casos onde a concentração molar de ácido conjugado é igual a da base conjugada ($[HA] = [A^-]$), a relação $[A^-]/[HA]$ é igual 1. Como o logaritmo de 1 é zero o pH da solução é igual ao valor do pK_a do ácido fraco.

Exercício 1.2

Calcular a quantidade relativa de ácido acético e de íon acetato presente quando 1 mol de ácido acético é titulado com 0,3 mol de hidróxido de sódio. Calcular também o valor do pH da solução final.

Solução:
Ao adicionar 0,3 mol de NaOH, 0,3 mol de ácido acético reage para formar 0,3 mol de íon acetato, deixando 0,7 mol de ácido acético. A composição é 70% de ácido acético e 30% de íon acetato.

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{Acetato}]}{[\text{Ácido acético}]}$$

$$pH = 4{,}75 + \log \frac{0{,}3}{0{,}7} = 4{,}39$$

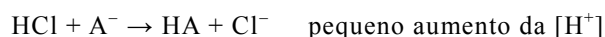
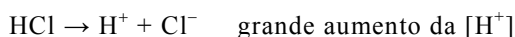
1.4 Tampões e tamponamento

A regulação do pH nos líquidos biológicos é atividade essencial dos organismos vivos. Mesmo pequenas mudanças na concentração do íon hidrogênio podem afetar grandemente as estruturas e as funções das biomoléculas. A concentração do H^+ é mantida relativamente constante por meio de soluções-tampões que resistem a

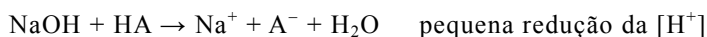
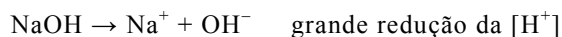
alterações bruscas de pH quando adicionadas quantidades relativamente pequenas de ácido (H^+) ou base (OH^-). São formados por ácidos fracos e suas bases conjugadas.

Quando um ácido forte como o HCl é adicionado a água pura, todo o ácido adicionado contribui diretamente para a redução do pH. No entanto, quando o HCl é adicionado a uma solução contendo um ácido fraco em equilíbrio com sua base conjugada (A^-), o pH não altera tão dramaticamente, pois parte dos prótons adicionados combinam com a base conjugada para amenizar o aumento da $[H^+]$ (Figura 1.6).

$$HCl \rightarrow H^+ + Cl^- \quad \text{grande aumento da } [H^+]$$

$$HCl + A^- \rightarrow HA + Cl^- \quad \text{pequeno aumento da } [H^+]$$

Quando uma base forte (como o NaOH) é adicionada a água pura ocorre grande redução da $[H^+]$. Se a base for adicionada a uma ácido fraco em equilíbrio com sua base conjugada (A^-), parte dos íons hidróxidos aceitam prótons do ácido para formar H_2O e, portanto, não contribuem para a redução do $[H^+]$.

$$NaOH \rightarrow Na^+ + OH^- \quad \text{grande redução da } [H^+]$$

$$NaOH + HA \rightarrow Na^+ + A^- + H_2O \quad \text{pequena redução da } [H^+]$$

O sistema ácido fraco/base conjugada (HA/A^-) atua como tampão para evitar mudanças bruscas do pH quando são adicionados ácidos ou bases a solução.

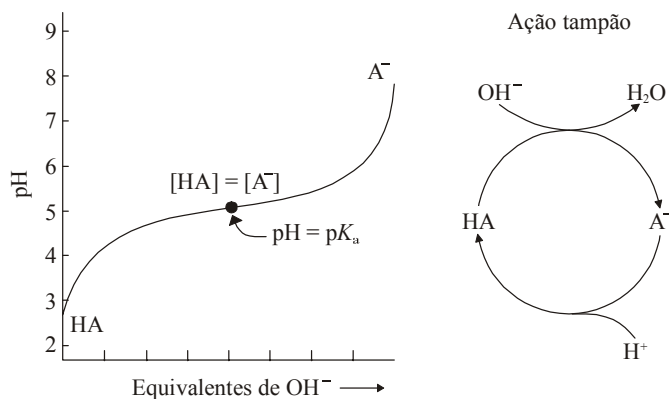



Figura 1.6
Capacidade tamponante do par ácido fraco (HA) e sua base conjugada (A^-). O sistema é capaz de absorver tanto H^+ como OH^- por meio da reversibilidade da dissociação do ácido. O doador de prótons (ácido fraco), contém uma reserva de H^+ ligado que pode ser liberada para neutralizar a adição de OH^- ao sistema resultando na formação de água. De forma semelhante, a base conjugada (A^-), pode reagir com os íons H^+ adicionados ao sistema. Assim, o par ácido–base conjugado resiste às variações de pH quando quantidades relativamente pequenas de ácido ou base são adicionadas à solução.

A resistência a mudanças no pH de um tampão depende de dois fatores: (a) a concentração molar do ácido fraco e sua base conjugada e (b) a relação entre suas concentrações.

Exercício 1.3

Calcular o valor do pH obtido quando 1,0 mL de HCl 0,1 M é adicionado a 99 mL de água pura. Calcular também o pH após a adição de 1,0 mL de NaOH 0,1 M a 99 mL de água pura. (Levar em conta a diluição tanto do ácido como da base ao volume final de 100 mL)

Solução:

Sobre a diluição, tem-se 100 mL de HCl 0,001 M e 100 mL de NaOH 0,001 M.

Ácido adicionado, $[H_3O^+] = 10^{-3}$, portanto, pH = 3.

Base adicionada,

$[0H^-] = 10^{-3}$ M.

Como $[OH^-][H_3O^+] = 1 \times 10^{-14}$, $[H_3O^+] = 10^{-11}$ M; portanto, pH = 11

A capacidade tamponante máxima de um ácido é quando o pH = pK_a do ácido fraco, ou seja, quando a as concentrações molares do ácido fraco (HA) e sua base conjugada (H^-) são iguais. Na realidade, a capacidade tamponante é considerável mesmo dentro de uma faixa de ±1,0 unidade de pH do valor de seu pK_a. Fora destes limites a ação tamponante é mínima. Esse fato está representado na curva de titulação do ácido acético (Figura 1.7). Para o par ácido acético/acetato (pK_a = 4,76) o tamponamento efetivo situa-se entre pH 3,76 e 5,76.

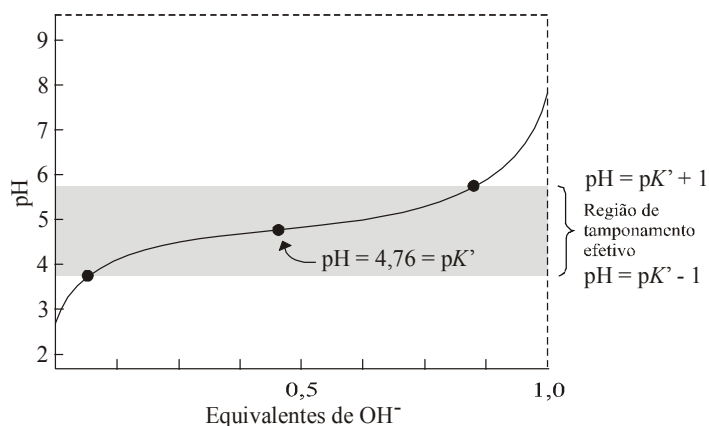



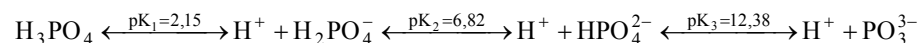
Figura 1.7

Curva de titulação do ácido acético por uma base (OH^-). No ponto inicial (antes da adição da base), o ácido está presente na forma CH_3COOH. A adição de base dissocia prótons até atingir o ponto médio da titulação onde o pH = p*K*, as concentrações do ácido (CH_3COOH) e de sua base conjugada (CH_3-COO^-) são iguais. A adição de mais base dissocia mais prótons até que todo o ácido atinja a forma CH_3COO^- (ponto final). Na região de tamponamento efetivo (P*K* ± 1), adições de ácidos ou bases não alteram grandemente o pH da solução.

A. Ácidos fracos com mais de um grupo ionizável

Algumas moléculas contêm mais de um grupo ionizável. O ácido fosfórico (H_3PO_4) é um ácido fraco poliprótico – pode doar três íons

hidrogênio. Durante a titulação com NaOH as ionizações ocorrem em etapas com a liberação de um próton por vez:

$$H_3PO_4 \xleftrightarrow{pK_1=2,15} H^+ + H_2PO_4^- \xleftrightarrow{pK_2=6,82} H^+ + HPO_4^{2-} \xleftrightarrow{pK_3=12,38} H^+ + PO_3^{3-}$$

Os valores de pK_1, pK_2 e pK_3 representam os pK_a de cada grupo ionizado (Figura 1.8).

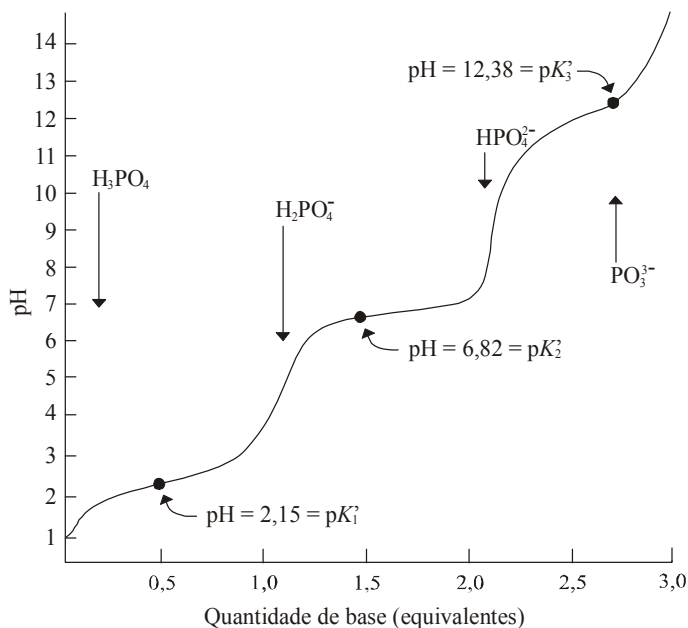
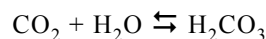



Figura 1.8
Curva de titulação do ácido fosfórico (poliprótico). O ácido fosfórico possui pK múltiplos, um para cada etapa da titulação.

B. Tampões fisiológicos

Os três tampões mais importantes no corpo humano são: tampão bicarbonato, o tampão fosfato e o tampão protéico. Cada um está adaptado para solucionar problemas fisiológicos específicos do organismo.

1. Tampão bicarbonato. Um caso especial de sistema tampão de grande importância nos mamíferos é o bicarbonato/ácido carbônico. O dióxido de carbono reage com a água para formar ácido carbônico:

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrows H_2CO_3$$

O ácido carbônico rapidamente se dissocia para formar íons H^+ e HCO^+:

$$H_2CO_3 \leftrightarrows H^+ + HCO_3^-$$

Como a concentração do H_2CO_3 é muito baixa no sangue, as equações acima podem ser simplificadas a:

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrows H^+ + HCO_3^-$$

O H_2CO_3 é um ácido relativamente fraco (pK_a = 6,37) e, consequentemente, um tampão ineficaz no sangue. A relação do HCO_3^-/CO_2 necessária para manter o pH = 7,4 (normal no sangue) é aproximadamente 11 para 1. Em outras palavras, o tampão bicarbonato atua no sangue quase no limite de seu poder tamponante. Além disso, as concentrações de CO_2 e HCO_3^- não são excepcionalmente altas. Apesar dessas dificuldades, o sistema tamponante do bicarbonato é importante, pois os dois compontes podem ser regulados. O dióxido de carbono é ajustado por alterações na velocidade da respiração. Enquanto, o teor de bicarbonato é regulado pelos rins.

O dióxido de carbono fisicamente dissolvido está em constante equilíbrio com o ácido carbônico e também com o CO_2 alveolar. Alterações em qualquer dos componentes na fase aquosa, provocam modificações no equilíbrio; por exemplo, o aumento do CO_2 eleva o H_2CO_3, que desvia o equilíbrio da reação de dissociação aumentando o H^+. Assim, o CO_2 é considerado parte do ácido conjugado e participa do componente ácido da equação:

$$K_a = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3][CO_2]}$$

Com a inclusão do CO_2 o valor de pK_a é 6,1. A quantidade de H_2CO_3 não-dissociado é menor que 1/700 do conteúdo de CO_2 e, normalmente, é desprezada. É uma prática comum referir-se ao CO_2 dissolvido como o ácido conjugado. Existe uma relação direta entre o pH do sangue e a pressão do gás dióxido de carbono nos pulmões.

Embora o pK_a para o sistema HCO_3^-/CO_2 seja 1,3 unidades de pH menor do que o pH extracelular normal de 7,40, este sistema tampona extremamente bem, porque o CO_2 pode ser regulado por alterações da ventilação alveolar.

2. Tampão fosfato. Consiste de um ácido fraco/base conjugada $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ (diidrogeno fosfato/hidrogeno fosfato):

$$H_2PO_4^- \leftrightarrows H^+ + HPO_4^{2-}$$

Com pK_a 7,2, poderia parecer que o tampão fosfato é uma escolha excelente para o tamponamento sangüíneo. No entanto, as concentrações do $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} no sangue são muito baixas para exercer atividade significante. Por outro lado, o sistema fosfato é fundamental para o tamponamento dos líquidos intracelulares onde suas concentrações são de, aproximadamente, 75 mEq/L. Os níveis de fosfato nos líquidos extracelulares como o sangue está ao redor de 4 mEq/L. Como o pH normal dos líquidos extracelulares é cerca de 7,2 (o intervalo é de 6,9 a 7,4) uma mistura equimolecular de $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} está presente. Apesar das células conterem outros ácidos, eles são de pouca importância pois seus valores de pK_a são baixos para o pH intracelular. Por exemplo, o ácido láctico tem um pK_a de 3,86.

3. Tampão de proteínas. As proteínas apresentam uma grande capacidade tamponante. Composta de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, as proteínas contêm vários grupos ionizáveis nas cadeias laterais que podem doar ou aceitar prótons. Como as moléculas de proteínas estão presentes em significantes

concentrações nos organismos vivos, elas são tampões poderosos. Por exemplo, a hemoglobina é a mais abundante biomolécula nas células sangüíneas e exerce um importante papel na manutenção do pH no sangue. Também presentes em altas concentrações e auxiliares na manutenção do pH são a albumina e outras proteínas séricas.

1.5 Biomoléculas

Os organismos vivos são compostos por milhares de moléculas inorgânicas e orgânicas diferentes. Contêm cerca de 27 elementos químicos. O número real depende do tipo de célula e a espécie de organismo. Acima de 99% da massa da maioria das células, são compostas por oito elementos denominados *elementos principais*. Os outros constituintes são *elementos secundários* (Quadro 1.1). A grande maioria dos constituintes moleculares dos sistemas vivos contém carbonos ligados covalentemente a outros carbonos e a átomos de hidrogênio, oxigênio e nitrogênio.

A. Carbono

O *carbono* (número atômico 6, peso atômico 12) é um átomo pequeno que tem quatro elétrons em seu orbital eletrônico externo que permite participar no compartilhamento com outros quatro átomos. Os elétrons externos do carbono estão arranjados ao redor do núcleo como um tetraedro, uma pirâmide com faces triangulares.

Uma das mais importantes propriedades do átomo de carbono é sua capacidade para formar ligações covalentes com outros átomos de carbono e com átomos de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre para formar cadeias ou anéis das macromoléculas. As propriedades de ligação do carbono permitem a produção de inúmeras moléculas. As ligações necessitam energia, exemplo: a ligação C-H requer 414 $kJ \cdot mol^{-1}$; a ligação C-C 343 $kJ \cdot mol^{-1}$; a ligação C-O 351 $kJ \cdot mol^{-1}$; a ligação C=C 615 $kJ \cdot mol^{-1}$ e a ligação C=O 686 $kJ \cdot mol^{-1}$.

As ligações simples carbono-carbono podem girar livremente a menos que estejam restritos por grupos muito grandes ou cargas elétricas. A rotação permite a uma molécula orgânica assumir diferentes formas chamadas conformações. As ligações duplas carbono-carbono:

- São mais curtas que as ligações simples.
- Apresentam rotação limitada.
- São mais rígidas, (propriedade importante em grandes moléculas).
- Variam o ângulo entre dois elétrons, afetando a conformação da molécula. Isto tem um grande impacto sobre a atividade biológica da molécula, que muitas vezes envolve uma interação que depende da conformação de outras moléculas.

As cadeias e anéis podem apresentar diferentes arranjos em suas ligações que se alternam dando origem a um *sistema de ligação conjugada*. Os elétrons da ligação movem-se no interior da molécula aumentando a estabilidade da estrutura. Esse fenômeno é chamado *estabilização por ressonância*.

Quadro 1.2 Talidomida

Durante o período entre 1957 e 1961, aproximadamente 10.000 pessoas em todo o mundo nasceram com membros deformados ou inexistentes após as mães terem ingerido a droga *talidomida,* um sedativo para tratar enjôos e náuseas durante a gravidez.

A talidomida pode existir em duas formas enanciométricas. Animais tratados com a R(+)–talidomida produziam neonatos normais enquanto aquelas que recebiam o enanciômero S(–) produziam nascituros deformados.

A talidomida prescrita para humanos era formada por uma mistura *racêmica* (mistura que contêm quantidades iguais de cada enanciômero).

Somente em 1995 foi comprovada que em humanos há uma rápida interconversão entre os dois enanciômeros. O equilíbrio é estabelecido entre as duas formas no sangue, independente de qual enanciômero foi empregado inicialmente. Isso sugere que, mesmo utilizando a forma pura r(+)–talidomida, os defeitos de nascimento em seres humanos seriam os mesmos.

De modo simplificado, consideram-se as moléculas biológicas como esqueletos de átomos de carbono ligados covalentemente entre si para formar cadeias longas, lineares ou ramificadas ou, ainda, estruturas cíclicas. Os *átomos de hidrogênio* que estão ligados aos átomos de carbono podem ser substituídos por N, O e S para formar uma grande variedade de grupos funcionais, tais como: aminas, aldeídos, álcoois e sulfidrilas. Isso confere uma grande variedade de propriedades químicas específicas encontradas nas moléculas e que determinam as suas funções biológicas específicas. As moléculas biológicas muitas vezes contêm mais que um grupo funcional e são denominadas *polifuncionais*. Por exemplo, os aminoácidos contêm grupos aminos e grupos carboxílicos.

Tabela 1.6 – Elementos encontrados nas células

Elementos principais		Oligoelementos	
Elemento	**Símbolo**	**Elemento**	**Símbolo**
Carbono	C	Arsênico	As
Hidrogênio	H	Boro	B
Nitrogênio	N	Cloro	Cl
Oxigênio	O	Cromo	Cr
Fósforo	P	Fluor	F
Enxofre	S	Iodo	I
Cálcio	Ca	Ferro	Fe
Potássio	K	Magnésio	Mg
		Manganês	Mn
		Molibdênio	Mo
		Níquel	Ni
		Selênio	Se
		Silicônio	Si
		Sódio	Na
		Estanho	Sn
		Vanádio	V
		Zinco	Zn

B. Estrutura tridimensional

Os compostos de carbono cujas composições são idênticas, mas as relações espaciais entre os átomos são diferentes, são denominados *estereoisômeros*. O átomo de carbono ligado a quatro substituintes diferentes é chamado assimétrico. Carbonos assimétricos são *centros quirais* indicando que os estereoisômeros podem ocorrer em formas orientadas à direita ou à esquerda. Os estereoisômeros são imagens especulares um do outro e não–superponíveis e são chamados *moléculas quirais*. Alguns estereoisômeros são *enanciômeros* e apresentam atividade óptica, ou seja, giram a luz plano-polarizada para a direita (dextrógiro) ou para a esquerda (levógiro). Uma mistura equimolar de dois enanciômeros é opticamente inativa (mistura racêmica).

As posições dos átomos ou grupos ao redor de um átomo de carbono quiral não estão relacionados com a direção do desvio da luz plano-polarizada de uma maneira simples. Emil Fisher em 1891, arbitrária e corretamente, designou uma das estruturas do gliceraldeído e chamou de D-gliceraldeído. O isômero levorrotatório foi chamado L-gliceraldeído. Atualmente, o gliceraldeído permanece como base da configuração estereoquímica das moléculas biológicas. Estereoisômeros de todas as moléculas quirais tem configurações estruturais relacionadas com um dos gliceraldeídos e são designadas D ou L independente de sua atividade óptica. A atividade óptica é indicada por (+) para dextrorrotatório e (–) para levórrotatório.

Os *centros quirais* são de grande importância biológica pois muitas moléculas são seletivas quanto a quiralidade, por exemplo, virtualmente todas as proteínas e polissacarídios dos organismos superiores são compostos por L–aminoácidos e D–monossacarídeos, respectivamente. Essa seletividade promove estabilidade adicional às moléculas poliméricas.

C. Macromoléculas

As macromoléculas são construídas pela união química de precursores relativamente simples (subunidades monoméricas) para formar polímeros de unidades repetidas. Todos os organismos vivos têm os mesmos tipos de subunidades monoméricas que além da formação de macromoléculas exercem, também, várias funções biológicas. As ligações específicas para cada tipo de macromolécula, são formadas por *reações de condensação* com perda de água, em processos que requerem o fornecimento de energia.

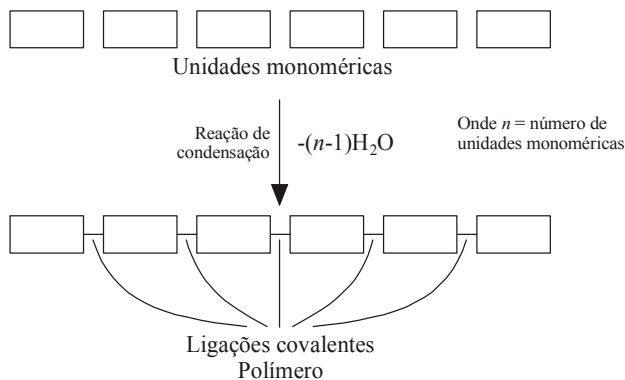



Figura 1.9
As macromoléculas são formadas a partir unidades monoméricas. As macromoléculas intracelulares são polímeros de elevada massa molecular formadas com precursores relativamente simples.

O tamanho de uma molécula é dado em termos de *massa molecular.* A unidade de massa empregada é o *dalton* (D) (1000 D = 1 kilodalton = kD) onde 1 D é definido como 1/12 da massa do átomo de ^{12}C.

As quatro principais classes de moléculas biológicas são:

1. Proteínas ou polipeptídeos. São longos polímeros formados por vinte diferentes aminoácidos. Apresentam elevada massa molecular que variam de centenas a milhões de daltons. Atuam como elementos estruturais, catalisadores (enzimas), anticorpos, transportadores, hormônios, reguladores gênicos, toxinas, etc.

2. Carboidratos. São polímeros de açúcares simples, como a glicose, com elevadas massas moleculares. Liberam e armazenam energia e também são elementos estruturais extracelulares.

3. Lipídeos. São formados por moléculas relativamente pequenas (ao redor de 300-1.500 D) que podem se associar para constituir grandes moléculas que servem, principalmente, como componentes estruturais das membranas, como forma de armazenamento de energia e outras funções (hormônios esteróides, vitaminas, proteção, material isolante).

Quadro 1.3 Sistema RS

O *sistema RS* de nomenclatura para a configuração estereoquímica foi desenvolvido em 1956 para superar o principal problema associado com a nomenclatura DL, que pode ser ambigüa para compostos com múltiplos centros quirais. O sistema RS compara os quatro átomos ou grupos ligados ao átomo de carbono tetraédrico (centro quiral). Cada grupo ligado ao centro quiral tem uma *prioridade*. As prioridades são: SH > OH > NH_2 > COOH > CHO > CH_2OH > CH_3 > H. A configuração do centro quiral é visualizada com o grupo de menor prioridade orientado para longe do observador, exemplo, o H no gliceraldeído.

Se a ordem dos outros três grupos diminui na direção horária, a configuração será considerada R (do latim, *rectus,* direita). Se a ordem for no sentido anti-horário, a configuração será considerada S (do latim, *sinistrus,* esquerda). Desse modo, o R–gliceraldeído é sinônimo de D–gliceraldeído. O sistema RS descreve sem ambigüidades a configuração estereoquímica de compostos contendo vários centros quirais, exemplo, (2S, 3R) –treonina.

4. Ácidos nucléicos (DNA e RNA). São polímeros formados por nucleotídeos. Armazenam, transmitem e transcrevem a informação genética. São componentes das organelas celulares.

Na Quadro 1.2 estão destacadas algumas características da construção das macromoléculas. Como exemplo, os carboidratos poliméricos são constituídos por monossacarídeos unidos por *ligações glicosídicas* para formar *oligossacarídeos* (2 a 10 unidades) ou *polissacarídeos* (mais de 10 unidades). Os oligossacarídeos são descritos como dissacarídeos, trissacarídeos ou tetrassacarídeos e assim por diante, de acordo com o número de unidades monoméricas. Nomenclatura similar é empregada para as proteínas e ácidos nucléicos. A maioria das macromoléculas contém uma ou poucas unidades monoméricas diferentes, por exemplo, o glicogênio é formado por uma única unidade monomérica, denominada glicose; o ácido desoxirribonucléico (DNA) contém somente quatro diferentes nucleotídios.

A forma precisa de uma estrutura polimérica é conferida pela natureza das ligações covalentes e das ligações não-covalentes. As três ligações não-covalentes fundamentais são: *pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas* e *forças de van der Waals*. Elas diferem quanto à geometria, à força e à especificidade. Além disso, essas ligações são grandemente afetadas pela presença da água. As ligações não-covalentes podem ocorrer entre átomos ou grupos funcionais na mesma cadeia ou entre cadeias adjacentes. A estrutura polimérica pode ser degradada em suas unidades monoméricas por hidrólise pela adição de água aos grupos que estão envolvidos nas ligações covalentes. Nos sistemas biológicos isto é conseguido pela ação catalisadora de enzimas.

As classes de macromoléculas biológicas não são mutuamente exclusivas e podem interagir para produzir *moléculas híbridas* ou *conjugadas.* Por exemplo, as proteínas e os carboidratos formam *proteoglicanos* ou *glicoproteínas.* Os proteoglicanos são fundamentalmente constituídos por polissacarídios (95% da massa da macromolécula) unidos entre si por ligações covalentes e não-covalentes às proteínas. As glicoproteínas contêm pequenas quantidades de carboidratos ligados às cadeias polipeptídicas por ligações covalentes.

Moléculas híbridas como os glicolipídeos, lipoproteínas e nucleoproteínas também estão presentes nos organismos vivos.

Quadro 1.2 – Comparação das classes de macromoléculas

Características	Carboidratos	Proteínas	Ácidos nucléicos
Unidades monoméricas	Monossacarídeos	Aminoácidos	Nucleotídeos
Ligação covalente formada por reação de condensação	Glicosídica	Peptídica	Fosfodiéster
Nomenclatura de unidades múltiplas:			
2-10 unidades	Oligossacarídeos	Olipeptídeos	Oligonucleotídeos
>10 unidades	Polissacarídeos	Polipetídeos	Polinucleotídeos
Ocorrência de pontes de hidrogênio	Intra e intermolecular	Intra e intermolecular	Intra e intermolecular
Enzima hidrolítica	Glicosidases	Peptidases	Nucleases

Finalmente, deve-se notar que a atividade biológica não está confinada a unidades monoméricas, ou grandes cadeias poliméricas ou ainda, a moléculas conjugadas. Existem muitos exemplos de oligômeros biologicamente ativos, como por exemplo, o glutationa (um tripeptídeo) que atua na manutenção da integridade das membranas.

1.1 Células: a unidade básica da vida

As *células* são as unidades estruturais e funcionais de todos os organismos vivos. Elas diferem amplamente em suas estruturas e funções, mas todas são circundadas por uma membrana que controla a troca de substâncias para o interior e para o exterior da célula.

As células são classificadas de acordo com seu tamanho e complexidade em uma das duas categorias:

- *Procarióticas* (do grego *pro,* antes), nas quais, o material genético *não* está delimitado em um envelope nuclear. Não possuem núcleo ou estruturas internas delimitadas por membrana. A sua estrutura é mantida pela parede celular. São organismos unicelulares que podem existir em associação, formando colônias de células independentes.

- *Eucarióticas* (do grego *eu*, "verdadeiro", e *karyon,* "núcleo"), contém o material genético organizado em cromossomos dentro de um envelope nuclear. São organismos complexos e podem ser unicelulares ou multicelulares. As células eucarióticas possuem várias organelas limitadas por membranas no seu citoplasma, tais como, lisossomos, peroxissomos, mitocôndrias, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi (Quadro 1.1).

Quadro 1.4 Célula

A palavra *célula* foi introduzida na biologia em 1665 por *Robert Hooke* em sua coleção de desenhos microscópicos, chamados *Micrographia,* que inclui uma fina fatia de cortiça. Ele registrou a estrutura de favos vazios da cortiça e denominou os compartimentos de células em analogia a cela de uma prisão ou mosteiro. O termo, atualmente, não é empregado para descrever o compartimento vazio mas o conteúdo vivo existente entre estas paredes celulares. Hoje, a célula pode ser definida como a mais simples unidade integrada nos sistemas vivos capazes de sobreviver independentemente.

No início do século 19, as células foram reconhecidas como formas vivas e como pertencentes a organismos multicelulares mais complexos. Em 1839, *Theodor Schwann,* um zoologista, publicou o *Mikroskopische Untersuchungen,* que contém figuras desenhadas por *Mathias Schleiden,* um botânico, que registrou semelhanças entre as células vegetais e animais. Vinte anos após, *Rudolf Virchow* anunciou 'omnis cellula et cellula', i.e. todas as células são provenientes de outras células.

O metabolismo celular é compartimentalizado para organizar as diferentes vias metabólicas como a síntese e degradação, em diversos compartimentos, para que operem independentemente. Algumas funções em diferentes organelas são mostradas no Quadro 1.3.

Quadro 1.3 – Resumo das funções das organelas

Organela	Função
Núcleo	Envolvido com uma membrana nuclear. Localização do DNA e proteínas (histonas); sítio da síntese da maior parte do DNA e do RNA.
Mitocôndria	Corpos separados constituídos por membranas altamente convolutas. Sítio de reações de oxidação produtoras de energia; possui o seu próprio DNA. Parte do sistema sintético: biossíntese e metabolismo energético.
Retículo endoplasmático	Membrana citoplasmática contínua com as membranas nuclear e plasmática; parte rugosa apresenta com ribossomos ligados
Complexo de Golgi	Série de membranas achatadas; envolvido na secreção de proteínas pela célula e em reações que ligam açúcares e outros componentes celulares.
Lisossomos	Vesículas envolvidas por membranas contendo vários tipos de enzimas hidrolíticas. Parte do sistema sintético (digestivo); hidrólise do material estranho, lise de células mortas.
Peroxissomos	Vesículas que contêm enzimas envolvidas no metabolismo do peróxido de hidrogênio.
Ribossomos	Compostos de partículas nucleoprotéicas (RNA e proteínas). Sítios da síntese protéica.
Membrana plasmática	É uma camada semipermeável contínua ao redor do citoplasma que separa o seu conteúdo da circunvizinhança. Contêm transportadores e receptores. Regula a troca com o meio.

Com base na comparação de moléculas de RNA, Carl Woese agrupou todos os organismos em três grupos fundamentais chamados *domínios: Eukarya* (eucariontes), *Bacteria* (anteriormente Eubacteria) e *Archaea* (anteriormente Archaebacteria). A *Eukaria* compreende todos os organismos macroscópicos, incluindo os seres humanos também como muitos organismos microscópicos unicelulares como os fungos. Os dois domínios, *Bacteria* e *Archaea*, consistem de procariontes.

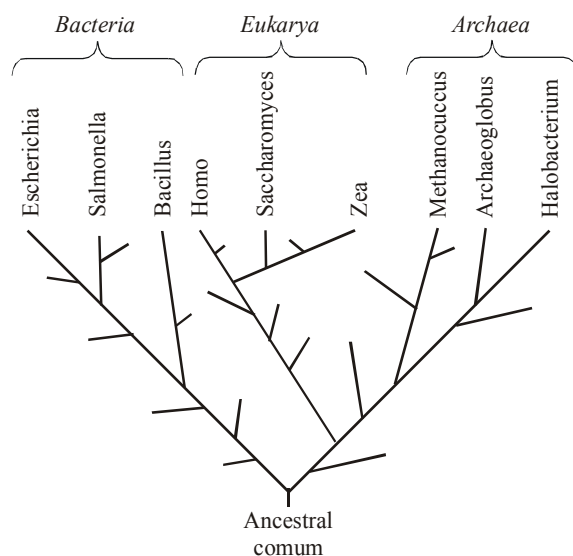



Figura 1.10
Árvore filogenética de classificação dos três domínios. O domínio *Eukaria* consiste de eucariotos. Os dois domínios, *Bacteria* e *Eukarya*, consistem de procariotos. Na evolução, os três domínios possuem um ancestral comum.

Resumo

1. A bioquímica é o estudo das estruturas moleculares, dos mecanismos e dos processos químicos responsáveis pela vida. Os organismos vivos são mantidos por sua capacidade de obter, transformar, armazenar e utilizar energia.

2. A água contribui com 50–90% do peso de uma célula. As moléculas de água são constituídas por dois átomos de hidrogênio e um de oxigênio. Cada átomo de hidrogênio está ligado ao átomo de hidrogênio por uma ligação covalente simples. As ligações oxigênio-hidrogênio são polares e as moléculas de água são dipolos. As moléculas de água podem formar pontes de hidrogênio entre o oxigênio de uma molécula e o hidrogênio de outra molécula.

3. As ligações não-covalentes são relativamente fracas e facilmente rompidas. Exercem papel fundamental na determinação das propriedades físicas e químicas da água e de biomoléculas. Interações iônicas ocorrem entre átomos e grupos carregados. O grande número de pontes de hidrogênio exerce considerável efeito nas moléculas envolvidas.

4. Os pontos de ebulição e fusão da água são excepcionalmente elevados quando comparados com compostos de estrutura e peso molecular semelhante. As pontes de hidrogênio são responsáveis por esse comportamento anômalo.

5. A estrutura dipolar da água e sua capacidade de formar pontes de hidrogênio permite a dissolução de muitas substâncias iônicas e polares.
6. As moléculas de água líquida apresentam capacidade limitada de ionizar-se para formar H^+ e OH. Quando uma solução contém quantidades iguais dos íons H^+ e OH^-, é considerada neutra. Soluções com excesso de H^+ são ácidas, enquanto aquelas com grande número de OH^- são básicas. Como os ácidos orgânicos não se dissociam completamente em água, são chamados de ácidos fracos. A constante de dissociação de um ácido, K_a, expressa a força de um ácido fraco. Em geral, o K_a é expresso como pK_a ($-\log K_a$).
7. A concentração do íon hidrogênio é expressa na forma de pH definido como o logaritmo negativo da concentração do íon hidrogênio ($-\log [H^+]$).
8. Os ácidos são definidos como doadores de prótons, a as bases como aceptores de prótons. A tendência de um ácido HA doar prótons é expressa pela sua constante de dissociação ($K_a = [H^+][A^-]/[HA]$).
9. A regulação do pH é essencial para a atividade dos seres vivos. A concentração do íon hidrogênio é mantida dentro de estreitos limites. As soluções tamponadas (par ácido–base conjugado) resistem a mudanças de pH. A capacidade máxima de tamponamento está situada uma unidade de pH acima ou abaixo do seu pK_a.
10. Várias propriedades físicas da água modificam as moléculas de soluto dissolvidas. Uma importante modificação é a pressão osmótica, a pressão que evita o fluxo de água através das membranas celulares.
11. Todos os seres vivos são constituídos de células procarióticas ou células eucarióticas. As procarióticas o material genético não está delimitado em um envelope nuclear. As eucarióticas apresentam o material genético dentro de um envelope nuclear. Essas células contêm núcleo e estruturas complexas que não são observadas nas procarióticas.

Referências

BLACKSTOCK, J. C, **Biochemistry.** Oxford: Butterworth, 1998. p. 1-19.

CAMPBELL, M. K. **Bioquimica.** 3 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2000. p. 64-87.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger: Princípios de bioquímica.** 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 3-85.

Capítulo

2

VALTER T. MOTTA

BIOQUÍMICA BÁSICA

Aminoácidos e proteínas

2

Aminoácidos e Proteínas

Objetivos

1. Descrever as propriedades dos aminoácidos encontrados nas proteínas.
2. Identificar os seguintes grupamentos químicos nas cadeias laterais dos aminoácidos: hidrofóbicos, alcoólicos, tiólicos, ácidos, básicos e amidas.
3. Descrever a dissociação dos aminoácidos em função da variação do pH.
4. Interpretar a curva de dissociação de um aminoácido neutro, de um aminoácido ácido e de um aminoácido básico.
5. Calcular o pI de um aminoácido, dados os seus pKs
6. Representar uma ligação peptídica entre dois aminoácidos.
7. Identificar numa cadeia polipeptídica: o amino−terminal, o carbóxi−terminal, os resíduos de aminoácidos, os radicais e a ligação peptídica.
8. Caracterizar os diferentes níveis estruturais das proteínas e descrever as forças responsáveis pelos mesmos.
9. Caracterizar a desnaturação protéica como uma modificação das propriedades físicas, químicas e biológicas das proteínas.
10. Descrever a estrutura, as propriedades e as funções das proteínas globulares e fibrosas.

As proteínas são as biomoléculas mais abundantes nos seres vivos e exercem funções fundamentais em todos os processos biológicos. São polímeros formados por unidades monoméricas chamadas *α-aminoácidos*, unidos entre si por ligações peptídicas. As proteínas são constituídas de 20 aminoácidos-padrão diferentes reunidos em combinações praticamente infinitas, possibilitando a formação de milhões de estruturas diversas.

2.1 Aminoácidos

Os α-aminoácidos possuem um átomo de carbono central (α) onde estão ligados covalentemente um grupo amino primário ($-NH_2$), um grupo carboxílico (–COOH), um átomo de hidrogênio e uma cadeia lateral (R) diferente para cada aminoácido (Figura 2.1). Existem duas exceções, a prolina e hidroxiprolina, que são α-iminoácidos.

$$H_3\overset{+}{N}-\underset{R}{\overset{H}{C}}-COO^-$$

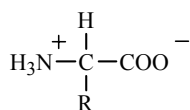



Figura 2.1
Estrutura de um α-aminoácido na forma de íon dipolar ("zwitterions").

Os α–aminoácidos com um único grupo amino e um único grupo carboxila, ocorrem em pH neutro na forma de *íons dipolares* ("zwitterions") eletricamente neutros. O grupo α–amino está protonado (íon amônio, $-NH_3^+$) e o grupo α–carboxílico está dissociado (íon carboxilato, $-COO^-$).

Os aminoácidos apresentam as seguintes propriedades gerais:

- Com exceção da *glicina*, todos os aminoácidos são *opticamente ativos* – desviam o plano da luz polarizada – pois o átomo de carbono α de tais moléculas é um *centro quiral*. São átomos de carbono ligados a quatro substituintes diferentes arranjados numa configuração tetraédrica e assimétrica. Os aminoácidos com átomos quirais podem existir como *estereoisômeros* – moléculas que diferem somente no arranjo espacial dos átomos.
- Os α–*aminoácidos* que constituem as proteínas têm a configuração estereoquímica L. Por convenção, na forma L, o grupo $\alpha-NH_3^+$ está projetado para a esquerda, enquanto na forma D, está direcionado para a direita. Os D-aminoácidos são encontrados em alguns antibióticos: valinomicina e actinomicina D; e em paredes de algumas bactérias: peptidoglicano. A designação L ou D de um aminoácido não indica a sua capacidade para desviar o plano da luz polarizada.
- A cadeia lateral (R) determina as propriedades de cada aminoácido.

Os α-aminoácidos são classificados em classes, com base na natureza das cadeias laterais (grupo R). Os 20 tipos de cadeias laterais dos aminoácidos variam em tamanho, forma, carga, capacidade de formação de pontes de hidrogênio, características hidrofóbicas e reatividade química. Os 20 aminoácidos-padrão são classificados pelos seus grupos R (cadeias laterais):

Aminoácidos com cadeias laterais não-polares e alifáticas

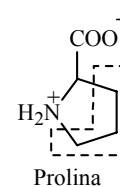
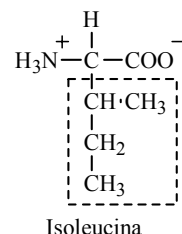
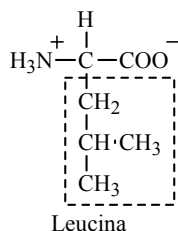
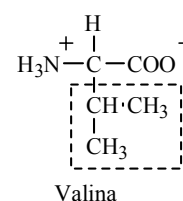
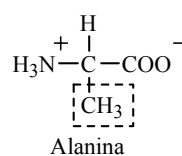
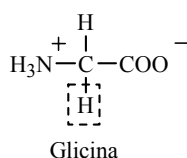
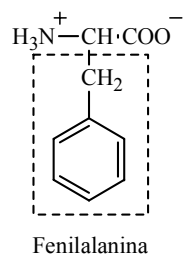
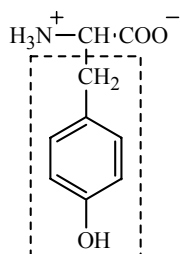
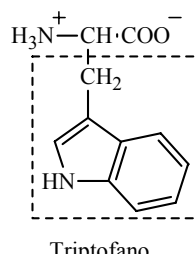
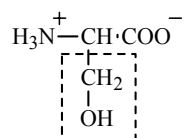
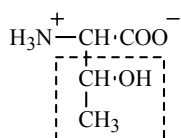
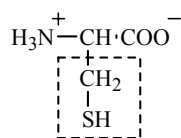
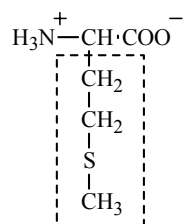
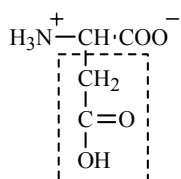
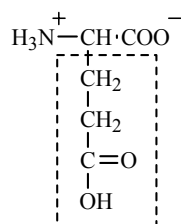
$$H_3\overset{+}{N}-\underset{H}{\overset{H}{C}}-COO^-$$
Glicina

$$H_3\overset{+}{N}-\underset{CH_3}{\overset{H}{C}}-COO^-$$
Alanina

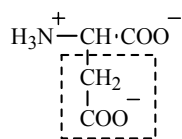
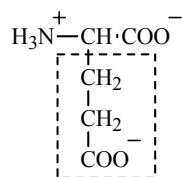
$$H_3\overset{+}{N}-\overset{H}{C}-COO^- \quad R = CH \cdot CH_3,\ CH_3$$
Valina

$$H_3\overset{+}{N}-\overset{H}{C}-COO^- \quad R = CH_2,\ CH \cdot CH_3,\ CH_3$$
Leucina

$$H_3\overset{+}{N}-\overset{H}{C}-COO^- \quad R = CH \cdot CH_3,\ CH_2,\ CH_3$$
Isoleucina

$$COO^-,\ H_2\overset{+}{N}$$
Prolina

Aminoácidos com cadeias laterais aromáticas

Aminoácidos com cadeias laterais polares não-carregadas

Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente (ácidos)

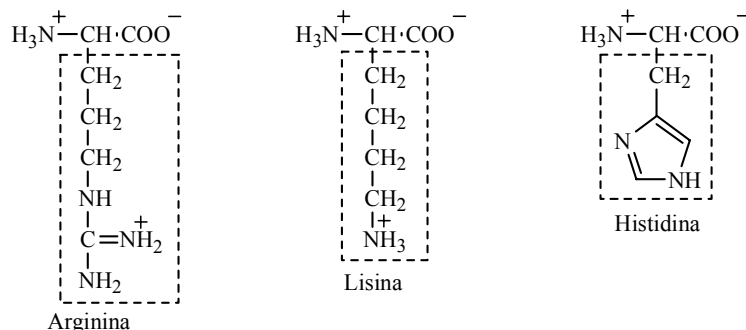
$H_3\overset{+}{N}—CH·COO^-$
CH_2
COO^-

Aspartato

$H_3\overset{+}{N}—CH·COO^-$
CH_2
CH_2
COO^-

Glutamato

Aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente (básicos)

$H_3\overset{+}{N}-CH{\cdot}COO^-$
CH_2
CH_2
CH_2
NH
$C=\overset{+}{N}H_2$
NH_2
Arginina

$H_3\overset{+}{N}-CH{\cdot}COO^-$
CH_2
CH_2
CH_2
CH_2
$\overset{+}{N}H_3$
Lisina

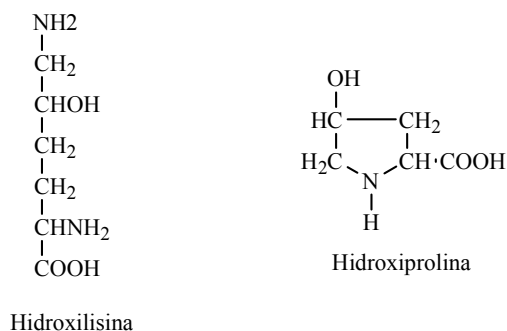
$H_3\overset{+}{N}-CH{\cdot}COO^-$
CH_2
N
NH
Histidina

A. Aminoácidos incomuns em proteínas

Várias proteínas contêm aminoácidos incomuns formados por modificação de resíduos de aminoácidos existentes na cadeia polipeptídica após a sua síntese. Entre eles está o *ácido γ–carboxiglutâmico*, um aminoácido ligado ao cálcio e encontrado na protrombina, uma proteína da cascata de coagulação sangüínea. A *hidroxiprolina* e a *hidroxilisina* produtos de hidroxilação da prolina e lisina, respectivamente, são importantes componentes estruturais do colágeno (*ver* adiante). A fosforilação dos aminoácidos contendo grupos hidroxila, tais como a serina, a treonina e a tirosina é empregada para regular a atividade das proteínas.

NH2
CH_2
CHOH
CH_2
CH_2
$CHNH_2$
COOH

Hidroxilisina

OH
$HC-CH_2$
H_2C $CH{\cdot}COOH$
N
H

Hidroxiprolina

B. Aminoácidos biologicamente ativos

Além da função primária como componentes das proteínas, os aminoácidos têm vários outros papéis biológicos.

- Vários α-aminoácidos ou seus derivados atuam como mensageiros químicos entre as células. Por exemplo, *glicina*, *ácido γ–aminobutírico* (GABA, um derivado do glutamato), *serotonina* e *melatonina* (derivados do triptofano) são neurotransmissores, substâncias liberadas de uma célula nervosa e que influenciam outras células vizinhas (nervosas ou musculares). A *tiroxina* (um derivado da tirosina produzida pela glândula tireóide) e *ácido indolacético* (um derivado do triptofano e encontrado nas plantas) são exemplos de hormônios.

- Os aminoácidos são precursores de várias moléculas complexas contendo nitrogênio. Exemplos incluem as bases nitrogenadas componentes dos *nucleotídeos* e *ácidos nucléicos*, o *heme* (grupo orgânico contendo ferro) e *clorofila* (pigmento de importância crítica na fotossíntese).
- Vários aminoácidos-padrão e aminoácidos–não–padrão atuam como intermediários metabólicos. Por exemplo, *arginina*, *citrulina* e *ornitina* são aminoácidos–não–padrão componentes do ciclo da uréia (Capítulo 10). A síntese da uréia – uma molécula formada no fígado – é o principal mecanismo de excreção do excesso de nitrogênio proveniente do catabolismo dos aminoácidos.

C. Titulação dos aminoácidos

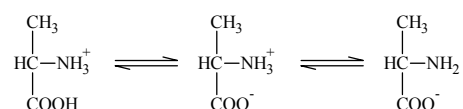
Como os α-aminoácidos possuem grupos ionizáveis na molécula, a forma iônica predominante dessas moléculas em solução depende do pH. A titulação dos aminoácidos ilustra o efeito do pH sobre sua estrutura. A titulação é também útil para determinar a reatividade das cadeias laterais dos aminoácidos.

As cadeias laterais R diferenciam um aminoácido de outro. O significado funcional da cadeia lateral é enfatizado nas proteínas onde o grupo α−carboxílico e o grupo α−amino formam ligações peptídicas e, portanto, não exercem suas propriedades ácidobásicas. Quando o grupo R é neutro, a sua composição tem pequeno efeito sobre as propriedades de dissociação dos grupos carboxílicos e grupos aminos do carbono α. Os aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis apresentam três grupos ácidobásicos. Na Tabela 2.1 estão relacionados os valores de pK' e pI dos grupos α–amino, α–carboxílico além de grupos ionizáveis das cadeias laterais dos aminoácidos.

Tabela 2.1 – Valores de pK′ e pI para os aminoácidos.

	Abreviações		pK			
Aminoácido	**Comum**	**Letra**	**α–COOH**	**α–NH₃**	**Outro (R)**	**pI**
Alanina	Ala	A	2,34	9,69	-	6,02
Arginina	Arg	R	2,17	9,04	12,48 (guanidino)	10,76
Ácido aspártico	Asp	D	2,09	9,82	3,86 (carboxil)	2,97
Asparagina	Asn	N	2,02	8,80	-	5,41
Ácido glutâmico	Glu	E	2,19	9,67	4,25 (carboxil)	3,22
Glutamina	Gln	Q	2,17	9,13	-	5,65
Cisteína	Cys	C	1,96	10,28	8,18 (sulfidril)	5,07
Cistina	-	-	1,65; 2,26	7,85; 9,85	-	5,06
Fenilalanina	Phe	F	1,83	9,13	-	5,48
Glicina	Gly	G	2,34	9,60	-	5,97
Histidina	His	H	1,82	9,17	6,0 (imidazol)	7,59
Hidroxilisina	Hyl	-	2,13	8,62	9,67 (ε-amino)	9,15
Hidroxiprolina	Hyp	-	1,92	9,73	-	5,83
Isoleucina	Ile	I	2,36	9,68	-	6,02
Leucina	Leu	L	2,36	9,60	-	5,98
Lisina	Lys	K	2,18	8,95	10,53 (ε-amino)	9,74
Metionina	Met	M	2,28	9,21	-	5,75
Prolina	Pro	P	1,99	10,.60	-	6,30
Serina	Ser	S	2,21	9,15	-	5,68
Tirosina	Tyr	Y	2,20	9,11	10,07 (fenol)	5,66
Treonina	Thr	T	2,63	10,43	-	6,53
Triptofano	Trp	W	2,38	9,39	-	5,66
Valina	Val	V	2,32	9,62	-	5,.97

Ao considerar a alanina em solução fortemente ácida (pH 0), tem-se os grupos ácido e básico da molécula totalmente protonados. Com a adição de uma base forte tal como NaOH, ocorre inicialmente a perda de próton do grupo α–COOH e, posteriormente, a perda do próton do grupo $\alpha-NH_3^+$.

$$\begin{matrix} CH_3 \\ | \\ HC-NH_3^+ \\ | \\ COOH \end{matrix} \rightleftharpoons \begin{matrix} CH_3 \\ | \\ HC-NH_3^+ \\ | \\ COO^- \end{matrix} \rightleftharpoons \begin{matrix} CH_3 \\ | \\ HC-NH_2 \\ | \\ COO^- \end{matrix}$$

A curva de titulação da alanina é mostrada na Figura 2.2.

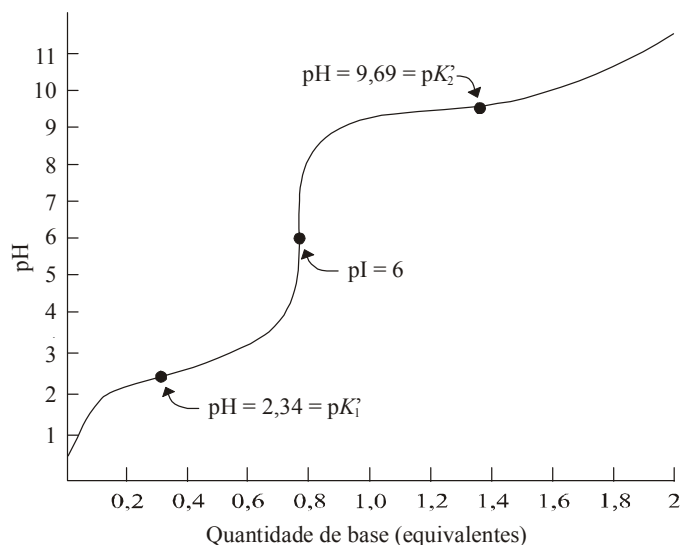



Figura 2.2
Curva de titulação da alanina

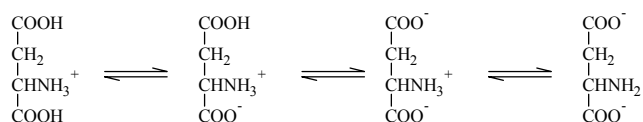
O valor de pH no qual o aminoácido fica eletricamente neutro (igual número de cargas positivas e negativas) corresponde ao *ponto isoelétrico* (p*I*). O valor do p*I* é uma constante de um composto em particular em condições específicas de força iônica e temperatura. Para o aminoácido monoamino e monocarboxílico, o ponto isoelétrico é calculado:

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

em que *K* são as constantes de dissociação dos grupos ácido e básico. Para a alanina tem-se:

$$pI = \frac{2{,}34 + 9{,}69}{2} = 6{,}02$$

Um exemplo mais complexo da relação entre a carga elétrica da molécula e o pH, é a titulação dos aminoácidos monoamino e dicarboxílicos cujos representantes são o ácido glutâmico e o ácido aspártico. Os dois aminoácidos possuem em suas cadeias laterais um segundo grupo carboxílico. Para o ácido aspártico tem-se:

$$\begin{matrix} COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CHNH_3^+ \\ | \\ COOH \end{matrix} \rightleftharpoons \begin{matrix} COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CHNH_3^+ \\ | \\ COO^- \end{matrix} \rightleftharpoons \begin{matrix} COO^- \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CHNH_3^+ \\ | \\ COO^- \end{matrix} \rightleftharpoons \begin{matrix} COO^- \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CHNH_2 \\ | \\ COO^- \end{matrix}$$

A curva de titulação do ácido aspártico é mostrada na Figura 2.3.

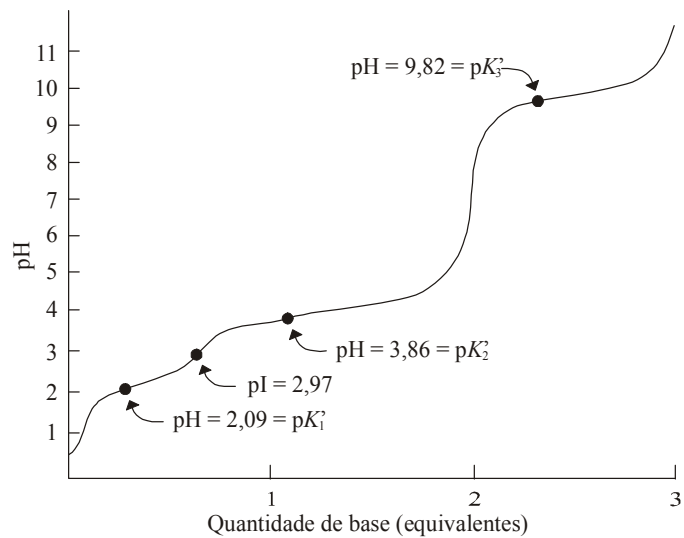
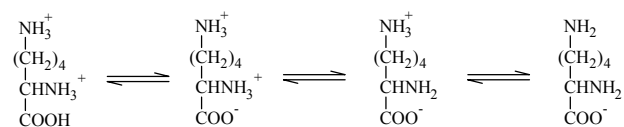



Figura 2.3
Curva de titulação do ácido aspártico

Para o ácido aspártico o pK' do α–COOH é 2,09, o pK' do grupo β–COOH é 3,86 e o pK' do $\alpha - NH_3^+$ é 9,82. O ponto isoelétrico (pI) é calculado pela fórmula:

$$pI = \frac{2{,}09 + 3{,}86}{2} = 2{,}97$$

A lisina é um exemplo de aminoácido com dois grupos básicos na molécula. O grupo ε–NH_2 da molécula confere basicidade.

$$\begin{matrix} NH_3^+ \\ | \\ (CH_2)_4 \\ | \\ CHNH_3^+ \\ | \\ COOH \end{matrix} \rightleftharpoons \begin{matrix} NH_3^+ \\ | \\ (CH_2)_4 \\ | \\ CHNH_3^+ \\ | \\ COO^- \end{matrix} \rightleftharpoons \begin{matrix} NH_3^+ \\ | \\ (CH_2)_4 \\ | \\ CHNH_2 \\ | \\ COO^- \end{matrix} \rightleftharpoons \begin{matrix} NH_2 \\ | \\ (CH_2)_4 \\ | \\ CHNH_2 \\ | \\ COO^- \end{matrix}$$

No caso da lisina o pK' do α–COOH é 2,18 o pK' da $\alpha - NH_3^+$ e o pK' do $\varepsilon - NH_3^+$ é 10,53. O ponto isoelétrico é calculado:

$$pI = \frac{8{,}95 + 10{,}53}{2} = 9{,}74$$

A curva de titulação da lisina é mostrada na Figura 2.4.

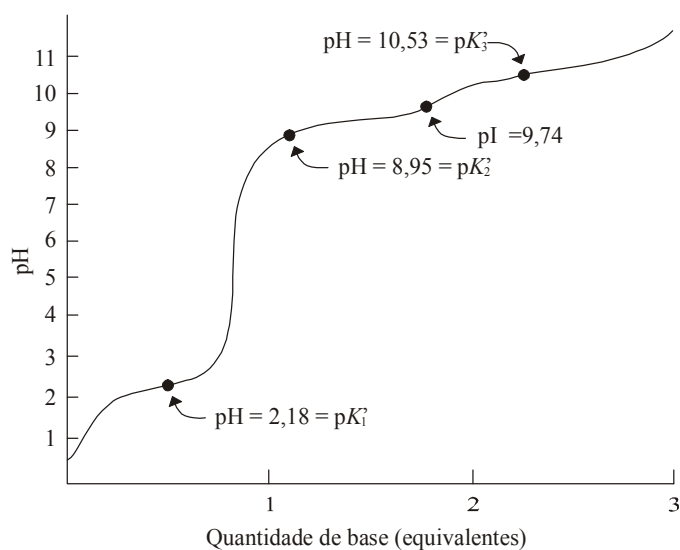



Figura 2.4
Curva de titulação da lisina

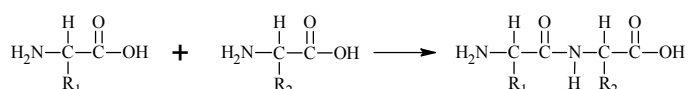
Tabela 2.2. Grupos ionizáveis de aminoácidos

Onde o grupo é encontrado	**Forma ácida**		**Forma básica**
Resíduo NH_2-terminal	$R—NH_3^+$ Amônio	⇌	$R—NH_2$ + H^+ Amina
Resíduo COOH-terminal	R—COOH Ácido carboxílico	⇌	$R—COO^-$ + H^+ Carboxilato
Arginina	$R—NH—C(NH_2)═NH_2^+$ Guanidínio	⇌	$R—NH—C(NH_2)═NH$ + H^+ Guanidino
Cisteína	R—SH Tiol	⇌	$R—S^-$ + H_2 Tiolato
Histidina	Imidazólio	⇌	+ H^+ Imidazol
Tirosina	R—C(CH═CH)(CH—CH)C—OH Fenol	⇌	$R—C(CH═CH)(CH—CH)C—O^-$ Fenolato

2.3 Reações dos aminoácidos

Os aminoácidos com seus grupos carboxílicos, grupos amino primários e os grupos presentes nas cadeias laterais podem sofrer diferentes reações químicas. Duas reações – *ligação peptídica* e a *oxidação da cisteína* (formação de pontes dissulfeto) – são de especial interesse por afetar a estrutura das proteínas.

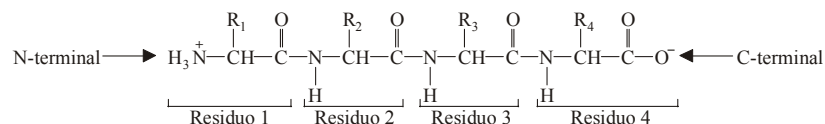
1. Formação de ligação peptídica. Os polipeptídeos são polímeros lineares compostos de aminoácidos ligados covalentemente entre si por ligações amida do grupo α–COOH de um aminoácido com o grupo α–NH_2 de outro, com a remoção da água (reação de condensação) para formar *ligações peptídicas.*

$$H_2N{-}\underset{R_1}{\overset{H}{C}}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}OH + H_2N{-}\underset{R_2}{\overset{H}{C}}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}OH \longrightarrow H_2N{-}\underset{R_1}{\overset{H}{C}}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}\underset{H}{N}{-}\underset{R_2}{\overset{H}{C}}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}OH$$

Após incorporação a peptídeos, os aminoácidos individuais são denominados *resíduos de aminoácidos*.

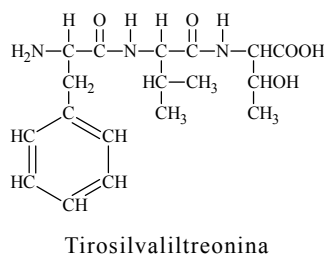
A estrutura que contém dois resíduos de aminoácidos é chamada *dipeptídeo*; com três aminoácidos *tripeptídeo*, etc. Quando um grande número de aminoácidos estão unidos dessa forma, o produto é denominado *polipeptídeo.* As proteínas podem conter centenas ou milhares de resíduos de aminoácidos.

Os polipeptídeos são geralmente representados com o grupo amino livre chamado *aminoterminal* ou *N–terminal* à esquerda e o grupo carboxílico livre denominado *carbóxi–terminal* ou *C–terminal* à direita.

$$\text{N-terminal} \rightarrow H_3\overset{+}{N}{-}\overset{R_1}{CH}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}\underset{H}{N}{-}\overset{R_2}{CH}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}\underset{H}{N}{-}\overset{R_3}{CH}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}\underset{H}{N}{-}\overset{R_4}{CH}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}O^- \leftarrow \text{C-terminal}$$

Residuo 1 | Residuo 2 | Residuo 3 | Residuo 4

A nomenclatura dos peptídeos pequenos é dada pela seqüência dos nomes de resíduos de aminoácidos que os formam e inicia a partir da esquerda com o resíduo que possui o grupo amino–terminal livre, substituindo–se o sufixo *–ina* pelo sufixo *–il*. Assim, são relacionados todos os aminoácidos que formam o polipeptídeo, com exceção do que contém o grupo carboxila livre que permanece com o nome original. Exemplo:

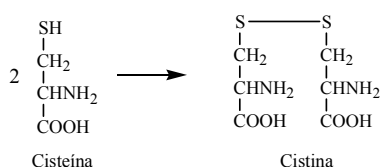
$$H_2N{-}\underset{\underset{C_6H_5}{|}}{\underset{CH_2}{\overset{H}{C}}}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}\overset{H}{N}{-}\underset{\underset{CH_3}{|}}{\underset{HC-CH_3}{\overset{H}{C}}}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}\overset{H}{N}{-}\underset{\underset{CH_3}{|}}{\underset{CHOH}{CHCOOH}}$$

Tirosilvaliltreonina

As principais características das ligações peptídicas são:

- Os seis átomos que formam a ligação Cα–CO–NH–Cα, estão no mesmo plano (Cα é o carbono alfa de aminoácidos adjacentes).
- O C=O e N–H da ligação são *trans* um em relação ao outro.
- A ligação C–N apresenta algumas características de dupla ligação parcial não podendo girar livremente.
- A livre rotação é possível para as ligações carbono–carbono e nitrogênio–carbono (não–carbonila), permitindo variações na conformação.

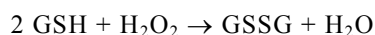
2. Oxidação da cisteína. O grupo sulfidrílico da cisteína é reversivelmente oxidado. A oxidação de duas moléculas de cisteína produz a *cistina* uma molécula que contém uma *ponte dissulfeto*. A síntese da cistina é realizada após a incorporação da cisteína às proteínas e exerce importante papel na estabilização da conformação protéica. A ligação covalente pode ocorrer entre cisteínas de uma única cadeia polipeptídica formando um anel ou entre cadeias separadas para formar pontes intermoleculares.

```
   SH              S ——————— S
   |               |         |
   CH2             CH2       CH2
2  |     ——→       |         |
   CHNH2           CHNH2     CHNH2
   |               |         |
   COOH            COOH      COOH

 Cisteína             Cistina
```

2.4 Peptídeos

Apesar de apresentarem estruturas menos complexas que as moléculas de proteínas, os peptídeos exercem atividades biológicas significantes.

O tripeptídeo *glutationa* (GSH, γ–L–glutamil-L–cisteinilglicina) contém uma ligação incomum γ–amida (é o grupo γ–carboxílico e não o grupo α–carboxílico do ácido glutâmico que participa da ligação peptídica). Encontrada em quase todos os organismos, a glutationa está envolvida em diferentes processos, tais como, síntese de proteínas e DNA, transporte de aminoácidos e metabolismo de fármacos e substâncias tóxicas. A glutationa também atua como agente redutor e protege as células dos efeitos destrutivos da oxidação por reação com substâncias como o peróxido (R–O–O–R), que são metabólitos reativos do O_2. Nos eritrócitos, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) oxida o ferro da hemoglobina para a forma férrica (Fe^{3+}). A metaemoglobina, o produto da reação, é incapaz de ligar o O_2. A glutationa protege contra a formação de metaemoglobina pela redução do H_2O_2 em reação catalisada pela enzima glutationa–peroxidase. No produto oxidado GSSG duas moléculas de GSH estão unidas por uma ponte dissulfeto entre seus grupos sulfidríla.

$$2\ GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + H_2O$$

A enzima γ–glutamil-transpeptidase participa do metabolismo da glutationa e é empregada como marcador para algumas hepatopatias, como carcinoma hepatocelular e hepatopatias por alcoolismo.

Quadro 2.1 Cromatografia de troca iônica

A *cromatografia de troca iônica* utiliza *colunas cromatográficas* que separam as moléculas com base na sua carga líquida. São usados compostos com grupamentos funcionais positiva ou negativamente carregados, tais como, dietilaminoetil ou carboximetila, covalentemente ligados a uma matriz sólida porosa (ex.: resinas à base de acrílico, agarose, sílica ou estireno divinilbenzeno) para formar *trocadores de cátions ou ânions.*

Quando uma solução contendo proteínas com cargas positivas e negativas é aplicada à coluna contendo um trocador de cargas de sinal contrário, as moléculas carregadas ligam-se por meio de interações iônicas a trocadores de cátions e ânions. Moléculas neutras ou carregadas com as mesmas cargas, movem-se através da coluna sem serem captadas. A separação das moléculas carregadas é usualmente realizada em solução-tampão com concentrações de íons salinos e pH apropriados (determinam os estados de ionização da molécula) que progressivamente, vão enfraquecendo as ligações iônicas.

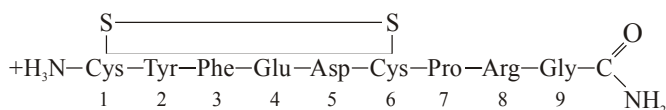
Alguns peptídeos atuam como moléculas de sinalização usadas para coordenar o imenso número de processos bioquímicos em organismos multicelulares. Os exemplos incluem o apetite, pressão sangüínea e a percepção da dor. O papel de alguns desses peptídeos são descritos brevemente.

Os estudos de regulação da ingestão de alimentos e do peso corporal tem revelado várias moléculas de sinalização no cérebro. Entre elas, estão os peptídeos estimulantes do apetite como o *neuropeptídeo Y* (NPY) e a *galanina*, e peptídeos inibidores do apetite como *colecistocinina* e *hormônio estimulador α–melanócito* (α–MSH). Evidências recentes sugerem que a *leptina*, um polipeptídeo produzido primariamente pelos adipócitos, exerce seus efeitos sobre o peso corporal e atua sobre o neuropeptídeo Y, a galanina e várias outras moléculas sinalizadoras para reduzir a ingestão de alimentos e aumentar o gasto calórico.

A pressão sangüínea – a força exercida pelo sangue contra as paredes dos vasos – é influenciada pelo volume sangüíneo e pela viscosidade. Dois peptídeos afetam o volume sangüíneo: a *vasopressina* e o *fator natriurético atrial*. A vasopressina, também chamada hormônio antidiurético (ADH), é sintetizada no hipotálamo e contêm nove resíduos de aminoácidos. O ADH estimula os rins a reter água. A estrutura do ADH é bastante similar a outro peptídeo produzido pelo hipotálamo chamado *oxitocina*, uma molécula de sinalização que estimula a liberação do leite pelas glândulas mamárias e influencia o comportamento sexual, maternal e social. A oxitocina produzida no útero estimula a contração uterina durante o parto. O fator natriurético atrial (FNA) – um peptídeo produzido por células atriais cardíacas em resposta a distensão – estimula a formação de urina diluída, um efeito oposto ao da vasopressina. O FNA exerce seus efeitos, em parte, pelo aumento da excreção de Na^+ pela urina, um processo que causa o aumento da excreção da água e a inibição da secreção de renina pelo rim.

S————————————S (ponte dissulfeto entre Cys 1 e Cys 6)

$^{+}H_3N$−Cys−Tyr−Phe−Glu−Asp−Cys−Pro−Arg−Gly−C(=O)NH_2

1 2 3 4 5 6 7 8 9

8-Arginina vasopressina (Hormônio antidiurético)

A *met–encefalina* e a *leu–encefalina* pertencem a um grupo de peptídeos chamados peptídeos–opiáceos, encontrados predominantemente nas células do tecido nervoso. Os peptídeos opiáceos são moléculas que atenuam a dor e produzem sensações agradáveis. Os pentapeptídeos leu–encefalina e met–encefalina diferem entre si somente pelos resíduos de aminoácidos dos C−terminais. A *substância P* e a *bradiquinina* estimulam a percepção de dor e apresentam efeitos opostos aos peptídeos opiáceos.

Um importante dipeptídeo comercial sintético é o adoçante artificial *aspartame* (éster metílico de L–aspartil–L–fenilalanina).

2.5 Proteínas

As proteínas são componentes essenciais à matéria viva. Atuam como catalizadores (enzimas), transportadores (oxigênio, vitaminas, fármacos, lipídeos, ferro, cobre, etc.), armazenamento (caseína do leite), proteção imune (anticorpos), reguladores (insulina, glucagon), movimento (actina e miosina), estruturais (colágeno), transmissão dos impulsos nervosos (neurotransmissores) e o controle do crescimento e diferenciação celular (fatores de crescimento)

Além das resumidas acima, citam-se algumas funções de grande importância fisiológica das proteínas: manutenção da distribuição de água entre o compartimento intersticial e o sistema vascular do organismo; participação da homeostase e coagulação sangüínea; nutrição de tecidos; formação de tampões para a manutenção do pH, etc.

Baseado na sua composição, as proteínas são divididas em *simples,* que consistem somente de cadeias polipeptídicas, e *conjugadas* que, além das cadeias polipeptídicas também possuem componentes orgânicos e inorgânicos. A porção não-peptídica das proteínas conjugadas é denominada *grupo prostético.* As mais importantes proteínas conjugadas são: nucleoproteínas, lipoproteínas, fosfoproteínas, metaloproteínas, glicoproteínas, hemoproteínas e flavoproteínas.

As proteínas variam amplamente em suas massas moleculares. Algumas atingem valores acima de um milhão de daltons. O limite mínimo é mais difícil de definir mas, em geral, considera-se que uma proteína quando existir pelo menos 40 resíduos de aminoácidos. Isso representa o ponto de demarcação no tamanho entre um polipeptídeo e uma proteína, entretanto deve-se enfatizar que essa é uma definição de conveniência, pois não existem diferenças marcantes nas propriedades dos polipeptídeos grandes e proteínas pequenas.

As propriedades fundamentais das proteínas permitem que elas participem de ampla variedade de funções:

- As proteínas são polímeros constituídos por unidades monoméricas chamadas α−aminoácidos.

Quadro 2.2 Cromatografia de filtração em gel

A *cromatografia de filtração em gel* separa as moléculas de acordo com seu tamanho e forma. Utiliza esferas porosas de um polímero insolúvel mas muito hidratado, como a agarose, dextrana ou poliacrilamida. As esferas são contêm poros de diferentes tamanhos. A separação acontece quando as moléculas de diferentes tamanhos são passadas através da coluna contendo as esferas porosas. As moléculas pequenas se distribuem dentro dos poros, enquanto as moléculas grandes não entram nos poros e passam rapidamente através da coluna.

Assim, moléculas de diferentes massas moleculares podem ser separadas quando passam pela coluna ("peneira molecular"). A resolução depende do tamanho da partícula, tamanho do poro, velocidade do fluxo, comprimento e diâmetro da coluna e o volume da amostra.

A técnica é aplicada no fracionamento de proteínas e polissacarídeos, determinação da massa molecular de proteínas e a purificação de ácidos nucléicos.

- As proteínas contêm vários grupos funcionais.
- As proteínas podem interagir entre si ou com outras macromoléculas para formar associações complexas.
- Algumas proteínas são bastante rígidas, enquanto outras apresentam flexibilidade limitada.

2.6 Estrutura das proteínas

A estrutura das proteínas é extraordinariamente complexa e seu estudo requer o conhecimento dos vários níveis de organização. A distinção dos níveis de organização é realizada em termos de natureza das interações necessárias para a sua manutenção. Destingem-se quatro níveis de organização existentes nas proteínas. Os conceitos a seguir destinam-se fundamentalmente a melhor compreensão das estruturas protéicas, pois existem casos de sobreposição entre os diferentes níveis de organização. As quatro estruturas são:

1. Primária: número, espécie e a seqüência dos aminoácidos unidos por ligações peptídicas e pontes dissulfeto. É especificada por informação genética.

2. Secundária: arranjos regulares e recorrentes da cadeia polipeptídica (α−hélice e folha β pregueada).

3. Terciária: pregueamento não periódico da cadeia polipeptídica, formando uma estrutura tridimensional estável.

4. Quaternária: arranjo espacial de duas ou mais cadeias polipeptídicas (ou subunidades protéicas) com a formação de complexos tridimensionais.

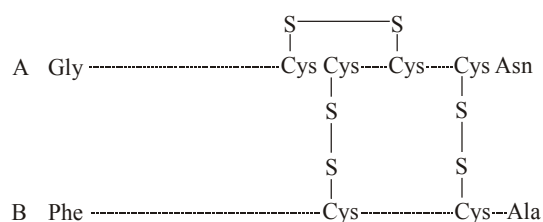
A. Estrutura primária

Cada cadeia polipeptídica tem uma seqüência específica de aminoácidos determinada por informação genética. A estrutura primária descreve o número de aminoácidos, a espécie, a seqüência (ordem) e a localização das pontes dissulfeto (cistina) de uma cadeia polipeptídica. A estrutura é estabilizada pelas ligações peptídicas e pontes dissulfeto. Polipeptídeos com funções e seqüências de aminoácidos similares são denominados *homólogos.*

O conhecimento das seqüências de aminoácidos em proteínas é importante por várias razões:

- Compreender como as proteínas realizam suas ações moleculares.
- Compreender os efeitos das mutações resultantes da substituição ou deleções de um ou mais aminoácidos nas proteínas.
- Verificar como proteínas similares em diferentes organismos podem contribuir com informações acerca das vias evolutivas.
- Comparar seqüências específicas de proteínas com funções similares em espécies diferentes.
- Identificar a presença de repetições de seqüências em diferentes proteínas para agrupá-las em famílias.
- Estudar da constituição de proteínas desconhecidas.

Atualmente são conhecidas as estruturas primárias de numerosas proteínas. A primeira a ser determinada foi a insulina (Sanger, 1953) que possui duas cadeias polipeptídicas: cadeia A (21 aminoácidos) e B (30 aminoácidos) que estão unidas entre si por duas pontes dissulfeto (Cys−S−S−Cys):

```
                          S────────S
                          |        |
A  Gly ·················Cys Cys····Cys····Cys Asn
                             |             |
                             S             S
                             |             |
                             S             S
                             |             |
B  Phe ····················Cys···········Cys···Ala
```

B. Estrutura secundária

As proteínas apresentam arranjos tridimensionais com dobramentos regulares denominados *estruturas secundárias das proteínas.* Esta estrutura é estabilizada por pontes de hidrogênio entre o oxigênio carbonil de uma ligação peptídica e o hidrogênio amida de uma outra ligação peptídica próxima (–NH····O=C–). A presença de numerosas pontes de hidrogênio entre as ligações peptídicas tem grande significado na estabilização da estrutura secundária. Existem dois tipos de estruturas secundárias: *α–hélice* e *folha β pregueada*.

α–Hélice

Na estrutura α-hélice, a molécula polipeptídica se apresenta como uma hélice orientada para a direita como se estivesse em torno de um cilindro, mantida por pontes de hidrogênio arranjadas entre os grupos C=O e o H–N das ligações peptídicas. Cada volta da hélice corresponde a 3,6 resíduos de aminoácidos (Figura 2.5). A distância que a hélice aumenta ao longo do eixo por volta é de 54 nm. As cadeias laterais R dos aminoácidos projetam-se para fora da hélice.

Quadro 2.3 Resina trocadora de íons

Diferentes trocadores de íons estão disponíveis para suprir necessidades específicas. A seleção do trocador de íon apropriado depende das propriedades das moléculas de interesse. Com moléculas anfotéricas, a estratégia de separação está baseada no pI e na estabilidade da molécula em diferentes valores de pH. Em pHs maiores que o pI, a molécula estará negativamente carregada; em pHs abaixo do pI estará positivamente carregada.

Assim, se a molécula é estável acima de seu valor de pI, um trocador de ânion é usado ou, ao contrário, se é estável abaixo do seu valor de pI, um trocador de cátion é empregado.

A cromatografia de troca iônica é usada em várias separações e purificações de moléculas biológicas, ex.: proteínas, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos e isoenzimas. É também utilizada na deionização da água ou em soluções de substâncias não-iônicas e na ultra-purificação de tampões, reagentes iônicos etc.

A presença dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina, cujas estruturas cíclicas relativamente rígidas não se encaixam à hélice, forçam a cadeia a dobrar-se rompendo a estrutura secundária regular. Esses dois aminoácidos, também como a glicina, favorecem a formação de conformação folha β pregueada (*ver* adiante). Seqüências polipeptídicas com grande número de aminoácidos com carga (ex.: ácido aspártico, ácido glutâmico) e grupos R volumosos (ex.: triptofano) são incompatíveis com a estrutura helicoidal pelos efeitos provocados por suas cadeias laterais.

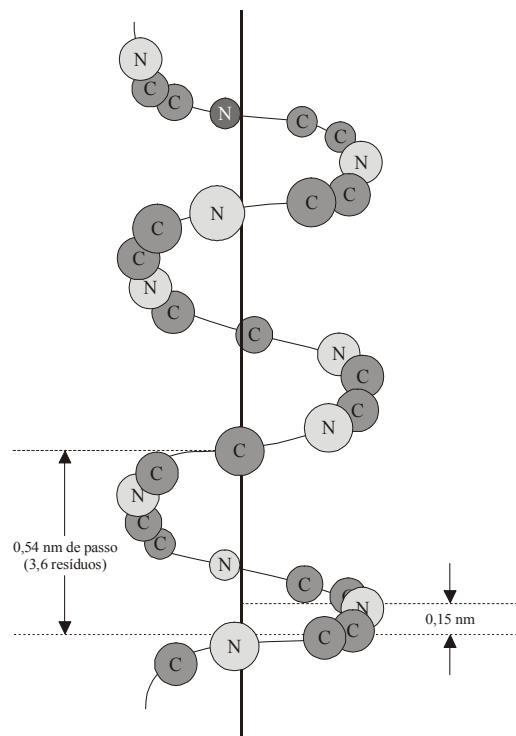



Figura 2.6
Estrutura helicoidal de um segmento polipeptídeo mostrando os locais das pontes de hidrogênio intracadeia (C=O---H–N).

Quadro 2.4 Cromatografia de afinidade

A *cromatografia de afinidade* envolve a propriedade de algumas proteínas de se ligarem por interações não-covalentes. Um ligante se liga covalentemente a uma matriz inerte, exemplo, agarose (uma matriz de resina sólida) que é colocada em uma coluna. Uma mistura de biomoléculas é passada através da coluna.

As substâncias sem afinidade pelo ligante passam pela coluna e são lavadas por um tampão. A proteína desejada liga-se ao ligante de forma específica de modo não-covalente. A proteína ligada pode ser eluída por solução de ligantes livres ou aplicando solventes orgânicos ou, ainda, por soluções de pH ou força iônica diferente.

Folha β pregueada

A estrutura de folha β pregueada resulta da formação de pontes de hidrogênio entre duas ou mais cadeias polipeptídicas adjacentes. As pontes de hidrogênio ocorrem entre os grupos C=O e N–H de ligações peptídicas pertencentes a cadeias polipeptídicas vizinhas em vez de no interior da cadeia (Figura 2.7). Cada segmento polipeptídico individual é denominado folha β. Diferentemente da α–hélice compacta, as cadeias polipeptídicas da folha β estão quase inteiramente estendidas.

Os segmentos polipeptídicos na folha β pregueada são alinhados no sentido paralelo ou antiparalelo em relação às cadeias vizinhas:

- *Estrutura folhas β paralelas* é formada por cadeias polipeptídicas com os N–terminais alinhados na mesma direção.
- *Estrutura folhas β antiparalelas*, os N–terminais de cada cadeia polipeptídica estão alinhados em direções opostas.

Ocasionalmente, misturas de cadeias paralelas e antiparalelas são observadas.

Paralela Anti-paralela

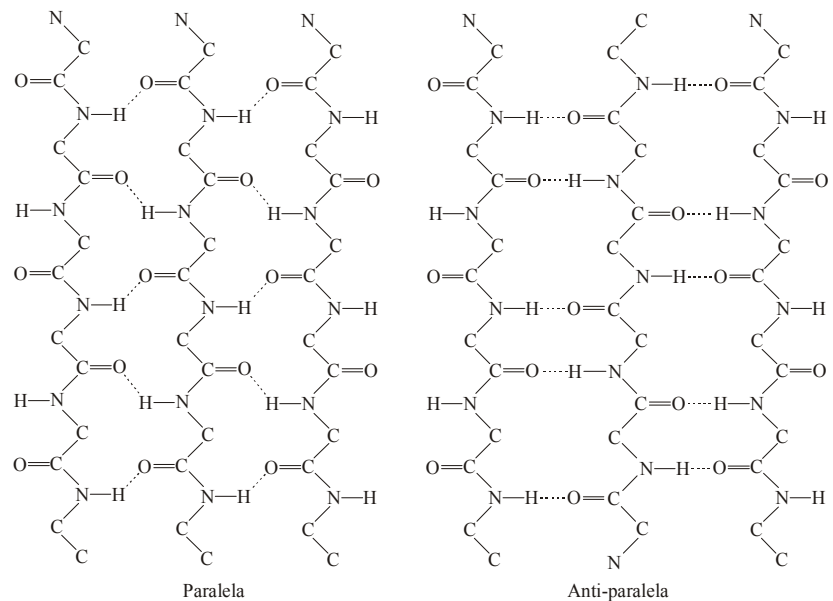



Figura 2.7
Estrutura de folha β pregueada entre cadeias polipeptídicas.

A representação esquemática das ligações intermoleculares e das cadeias paralelas dispostas em estrutura de folha pregueada são mostradas na Figura 2.7. Nessas estruturas as cadeias laterais (R) são projetadas para cima e para baixo aos planos formados pelas pontes de hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas.

Estrutura secundária irregular

As α–hélices e as folhas β pregueadas são classificadas como estruturas secundárias regulares, pois seus componentes exibem conformações estruturais periódicas. Dependendo da natureza das cadeias laterais dos aminoácidos presentes, as α–hélices e as folhas β pregueadas podem se apresentar levemente distorcidas em sua conformação específica.

Muitas proteínas apresentam combinações de estruturas *α–hélice* e de estruturas *folha β pregueada* em proporções variadas. As combinações produzem vários arranjos denominados de *estruturas supersecundárias* ou *motivos* cujas variações são:

- *Motivo βαβ,* em que duas folhas β pregueadas paralelas estão conectadas a uma α–hélice.
- *Motivo β meandro,* onde duas folhas β pregueadas antiparalelas estão conectadas por aminoácidos polares e glicina que efetuam uma mudança brusca de direção da cadeia polipeptídica.
- *Motivo αα,* onde duas α–hélices antiparalelas consecutivas estão separadas por uma alça ou segmento não-helicoidal.
- *Barris β,* são formados quando várias folhas β pregueadas enrolam-se sobre si mesmas.

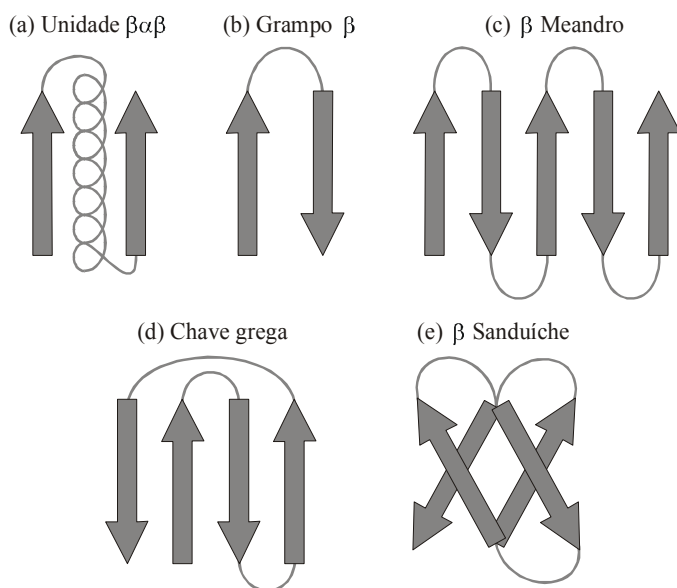



Figura 2.8
Algumas estruturas supersecundárias (motivos-proteína). As setas indicam as direções das cadeias polipeptídicas. (a) Motivo βαβ, (b) motivo grampo, (c) motivo β meandro, (d) motivo chave grega e (e) β sanduíche.

As estruturas secundárias e supersecundárias de grandes proteínas, geralmente, são organizadas como domínios – regiões compactas semiindependentes ligadas entre si por uma cadeia polipeptídica.

C. Estrutura terciária

A estrutura terciária descreve a conformação específica da cadeia polipeptídica secundária que resulta numa estrutura mais compacta onde os átomos ocupam posições específicas. O *dobramento protéico* é um processo no qual uma molécula não organizada, nascente (recentemente sintetizada) adquire uma estrutura altamente organizada como conseqüência de interações entre as cadeias laterais presentes na sua estrutura primária. A estrutura terciária apresenta várias características importantes:

- Muitos polipeptídeos dobram de modo que os resíduos de aminoácidos que estão distantes um do outro na estrutura primária podem estar próximos na estrutura terciária.
- Devido ao empacotamento eficiente pelo dobramento da cadeia polipeptídica, as proteínas globulares são compactas. Durante o processo, a maioria das moléculas de água são excluídas do interior da proteína tornando possível interações entre grupos polares e não–polares.
- Algumas cadeias polipeptídicas dobram-se em duas ou mais regiões compactas conectadas por um segmento flexível de cadeia polipeptídica. Essas unidades globulares compactas, chamadas *domínios*, são formadas por 30 a 400 resíduos de aminoácidos. *Dominios* são segmentos estruturalmente independentes que têm

funções específicas. Por exemplo, o receptor protéico CD4, que permite a ligação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) com a célula do hospedeiro, é formado por quatro domínios similares de aproximadamente 100 aminoácidos cada. As pequenas proteínas possuem, geralmente, apenas um domínio.

A estrutura terciária tridimensional das proteínas é estabilizada por interações entre as cadeias laterais:

1. Interações hidrofóbicas. São as forças não-covalentes mais importantes para a estabilidade da estrutura enovelada. As interações são resultantes da tendência das cadeias laterais hidrofóbicas – presentes na alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina e valina – de serem atraídas umas pelas outras para agruparem-se em áreas específicas e definidas para minimizar seus contatos com a água. Quando circundados por moléculas de água, os grupos hidrofóbicos são induzidos a juntarem-se para ocupar o menor volume possível. Assim, as moléculas de água altamente ordenadas são liberadas do interior, aumentando a desordem do sistema (entropia). O aumento da entropia é termodinamicamente favorável e dirige o dobramento protéico.

2 Interações eletrostáticas (ligações iônicas). Grupos carregados positivamente como os grupos ε-amino, ($-NH_3^+$), nas cadeias laterais de resíduos de lisina podem interagir com grupos carregados negativamente, como o grupo carboxila ($-COO^-$) do ácido glutâmico ou ácido aspártico. Cerca de dois terços dos resíduos de aminoácidos com cargas nas proteínas formam *pares iônicos* (ou *pontes salinas:* associação de dois grupos iônicos de cargas opostas).

3. Ligações covalentes. O único tipo de ligação covalente presente na manutenção da estrutura terciária é a ponte dissulfeto formada de dois grupos sulfidrila de cadeias laterais de duas cisteínas (Cys−S−S−Cys) para produzir uma cistina. As pontes dissulfeto separadas uma da outra na estrutura primária (intracadeia) ou entre duas cadeias polipeptídicas (intercadeias) formam-se à medida que a proteína se dobra para adquirir a sua conformação nativa. No meio extracelular, essas ligações protegem parcialmente a estrutura das proteínas de modificações adversas de pH e das concentrações de sais. As proteínas intracelulares raramente contêm pontes dissulfeto devido às altas concentrações citoplasmáticas de agentes redutores.

4. Pontes de hidrogênio. Grande número de pontes hidrogênio são formadas no interior e na superfície das proteínas (são pontes diferentes daquelas envolvidas na manutenção de α−hélice ou folha β pregueada). Além de formar pontes de hidrogênio entre si, os grupos polares das cadeias laterais dos aminoácidos podem interagir com a água ou com o esqueleto polipeptídico. As pontes de hidrogênio contribuem moderadamente para direcionar o enovelamento.

5. Forças de van der Waals. É uma força de atração inespecífica que ocorre quando dois átomos quaisquer estão próximos. Podem existir entre unidades de fenilalanina e tirosina próximas umas das outras ou entre resíduos vizinhos de serina. As forças de van der Waals são também proeminentes entre as cadeias laterais envolvidas nas interações hidrofóbicas. Apesar dessas forças serem comparativamente fracas (Tabela 2.3), o efeito acumulativo de

numerosos sítios de interação tem substancial influência para a estabilidade da estrutura enovelada.

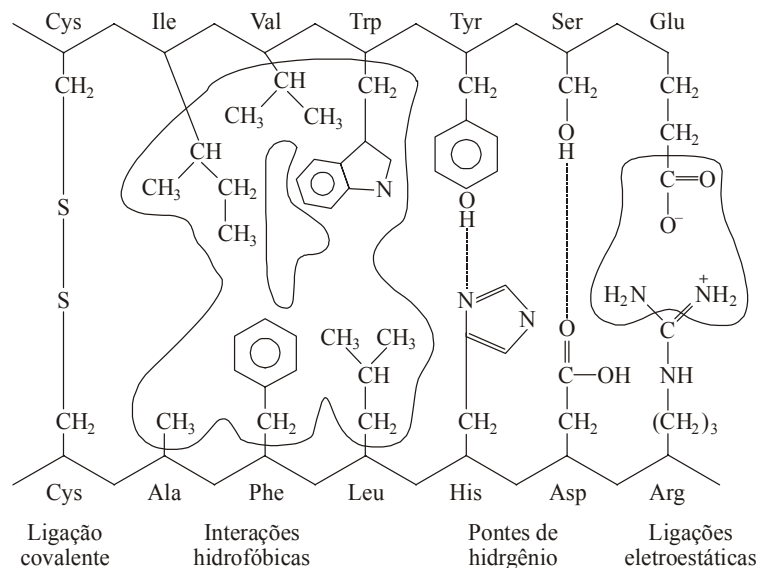



Figura 2.9
Ligações ou interações que estabilizam a estrutura terciária das proteínas.

Os íons metálicos também podem formar ligações cruzadas internas nas proteínas. Exemplo, os domínios contendo ligações cruzadas chamadas *dedos de zinco* são comuns em proteínas ligadoras de DNA. Essas estruturas consistem de 20-60 resíduos com um ou dois íons Zn^{2+}. Os íons Zn^{2+} são coordenados em um tetraedro pelas cadeias laterais de Cys e/ou His e, algumas vezes, Asp ou Glu. Os domínios são muito pequenos para assumir uma estrutura terciária estável na ausência de Zn^{2+}. O zinco é um íon ideal para estabilizar proteínas; ele pode interagir com vários ligantes (S, N ou O) provenientes de vários aminoácidos.

D. Estrutura quaternária

Muitas proteínas são multiméricas, ou seja, são compostas por por duas ou mais cadeias poliptídicas. As cadeias individuais de polipeptídeos – chamadas *protômeros* ou *subunidades* – estão associadas por interações *não–covalentes:* efeitos hidrofóbicos, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas. O arranjo espacial das subunidades é conhecido como estrutura quaternária das proteínas. As proteínas multiméricas em que algumas ou todas as subunidades são idênticas, denominam-se *oligômeros.* Os oligômeros são compostos de *protômeros*, que podem consistir de uma ou mais subunidades. Grande quantidade de proteínas oligoméricas contêm duas ou quatro subunidades protoméricas, e são chamadas de diméricas ou tetraméricas, respectivamente.

Existem várias razões para a existência de proteínas multissubunidades:

- A síntese isolada de subunidades é mais eficiente que aumentos de tamanho da cadeia polipeptídica única.
- Em complexos supramoleculares como as fibrilas do colágeno, a reposição de pequenos componentes defeituosos é um processo mais eficiente.
- As interações complexas de múltiplas subunidades ajudam a regular as funções protéicas.

Um exemplo de estrutura quaternária é a hemoglobina formada por quatro subunidades, ligadas entre si numa configuração específica (oligômero). Cada uma das subunidades é caracterizada por sua própria estrutura secundária e terciária. As interações dos polipeptídeos ocorrem entre os grupos desprotegidos que não participam do enovelamento da cadeia (estrutura terciária) (*ver* Proteínas globulares). Por outro lado, a enzima α–quimotripsina não possui estrutura quaternária apesar de ser formada por três cadeias polipeptídicas, já que essas subunidades estão unidas entre si por ligações covalentes.

E. Proteínas chaperones

É uma família de proteínas que previnem a agregação de proteínas recém-sintetizadas antes que elas assumam sua forma ativa, sem alterar o resultado final do processo de enovelamento. As *proteínas de choque térmico* (hsp, heat shock protein) cuja síntese é aumentada em temperaturas elevadas, é um exemplo de chaperones que se liga a polipeptídeos à medida que são sintetizadas nos ribossomos. Existem duas classes principais de chaperones: a família hsp70, de proteínas de peso moleculares 70 kD, e as *chaperoninas*.

F. Dinâmica protéica

Apesar da importância das forças que estabilizam as estruturas, deve-se reconhecer que as funções das proteínas exigem um certo grau de flexibilidade. O significado da flexibilidade conformacional (flutuações contínuas e rápidas na orientação dos átomos na proteína) foi demonstrado nas interações proteínas-ligantes. A função protéica muitas vezes envolve a rápida abertura e fechamento de cavidades na superfície da molécula. A velocidade com que as enzimas catalisam reações está limitada em parte pela rapidez com que o produto é liberado do sítio ativo. A transferência de informações entre biomoléculas é acompanhada por modificações na estrutura tridimensional. Por exemplo, a conformação das subunidades das moléculas de hemoglobina sofre modificações estruturais específicas com a ligação e liberação do oxigênio da molécula.

2.7 Desnaturação e renaturação

A desnaturação ocorre pela alteração da conformação tridimensional nativa das proteínas (estrutura secundária, terciária e quaternária) sem romper as ligações peptídicas (estrutura primária). Como a estrutura tridimensional específica das proteínas é fundamental para o exercício de suas funções, alterações estruturais

provocadas pela desnaturação ocasionam a *perda* parcial ou completa das suas funções biológicas.

Muitas vezes, em condições fisiológicas, as proteínas recuperam a conformação nativa e restauram atividade biológica quando o agente desnaturante é removido em processo denominado *renaturação*.

A desnaturação ocorre nas seguintes condições:

1. Ácidos e bases fortes. Modificações no pH resultam em alterações no estado iônico de cadeias laterais das proteínas, que modificam as pontes de hidrogênio e as pontes salinas (associação de grupos iônicos de proteínas de carga oposta). Muitas proteínas tornam-se insolúveis e precipitam na solução.

2. Solventes orgânicos. Solventes orgânicos solúveis em água como o etanol, interferem com as interações hidrofóbicas por sua interação com os grupos R não−polares e forma pontes de hidrogênio com a água e grupos protéicos polares. Os solventes não-polares também rompem interações hidrofóbicas.

3. Detergentes. As moléculas anfipáticas interferem com as interações hidrofóbicas e podem desenrolar as cadeias polipeptídicas.

4. Agentes redutores. Em presença de reagentes como a uréia e β−mercaptoetanol ocorre a conversão das pontes dissulfeto em grupos sulfidrílicos. A uréia rompe pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

5. Concentração de sais. A ligação de íons salinos a grupos ionizáveis das proteínas enfraquecem as interações entre grupos de cargas opostas da molécula protéica. As moléculas de água solvatam os grupos protéicos. Com a adição de grandes quantidades de sal às proteínas em solução, formam-se precipitados. As moléculas de água competem pelo sal adicionado tornando a quantidade de solvente muito pequena e, com isso, promovendo a agregação de moléculas protéicas e a sua precipitação. Esse efeito é chamado *salting out.*

6. Íons de metais pesados. Metais pesados como o mercúrio (Hg^{2+}) e chumbo (Pb^{2+}) afetam a estrutura protéica de várias formas. Podem romper as pontes salinas pela formação de ligações iônicas com grupos carregados negativamente. Os metais pesados também se ligam com grupos sulfidrílicos, um processo que pode resultar em profundas alterações das estruturas e funções protéicas. Por exemplo, o chumbo liga-se aos grupos sulfidrílicos de duas enzimas da via sintética da hemoglobina causando anemia severa (na anemia o número de eritrócitos ou da concentração de hemoglobina no sangue estão abaixo dos valores de referência).

7. Alterações na temperatura. Com o aumento da temperatura, a velocidade de vibração molecular aumenta. Eventualmente, interações fracas como as pontes de hidrogênio são rompidas promovendo alterações na conformação das proteínas.

8. Estresse mecânico. Agitação e trituração rompem o delicado equilíbrio de forças que mantém a estrutura protéica. Por exemplo, a espuma formada quando a clara do ovo é batida vigorosamente contém proteína desnaturada.

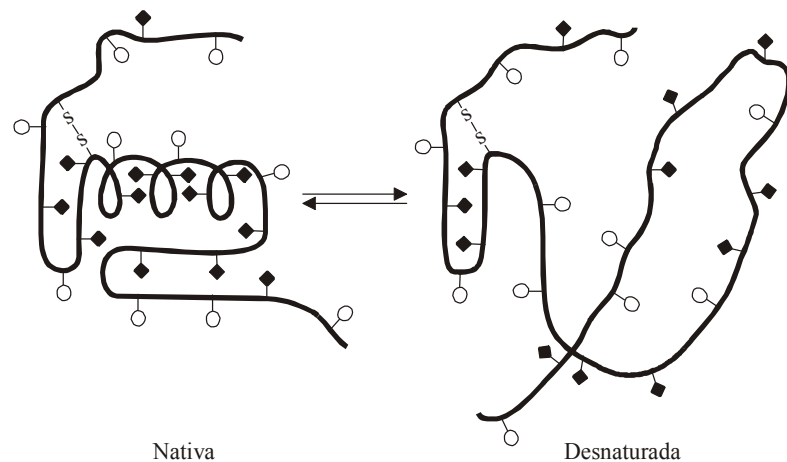



Figura 2.10
Desnaturação de proteínas

2.8 Proteínas fibrosas

As *proteínas fibrosas* tipicamente contêm altas proporções de estruturas secundárias regulares, como α–hélices ou folha β pregueadas. Compõem os materiais estruturais de órgãos e tecidos, dando a eles elasticidade e/ou resistência. Em geral, são pouco solúveis em água pela presença de teores elevados de aminoácidos hidrófobos tanto no interior como no exterior das cadeias polipeptídicas helicoidais reunidas em feixes. São exemplos característicos da relação entre a estrutura protéica e a função biológica. As principais proteínas fibrosas são: o *colágeno*, as *α–queratinas* e a *fibroína da seda*.

A. Colágeno

O *colágeno* é a proteína mais abundante em vertebrados sendo componente essencial do tecido conjuntivo que, numa variedade de formas geneticamente distintas, se distribui pela matriz óssea, pele, tendões, cartilagens, córnea, vasos sangüíneos, dentes e outros tecidos. É sintetizado pelas células do tecido conjuntivo e secretada para o espaço extracelular para fazer parte de uma rede complexa de macromoléculas localizadas na matriz extracelular.

Quadro 2.5 Osteogenesis imperfecta

A *osteogenesis imperfecta,* também conhecida como *doença dos ossos quebradiços,* é um grupo de pelo menos quatro doenças clínica, genética e bioquimicamente distintas com prevalência de 1:10.000. A gravidade da doença varia de moderada a letal e depende da natureza e da posição da mutação. Nas formas mais severas, mais de 100 fraturas *in útero* foram relatadas com o resultante parto de natimorto.

O defeito fundamental são mutações nos genes do procolágeno Tipo I. Na maioria das mutações ocorre a substituição de uma única base no códon para a glicina, resultando na distorção da hélice tríplice do colágeno.

A estabilidade da estrutura do colágeno é reduzida pelo rompimento da ponte de hidrogênio N–H do esqueleto de cada alanina (normalmente glicina) ao grupo carbonila da prolina adjacente da cadeia vizinha.

A posição da aberração está relacionada com a gravidade da doença. Mutações próximas do C-terminal são mais severas que as mais próximas do N-terminal. Isso porque a formação da hélice tríplice inicia a partir do C-terminal e progride em direção ao N-terminal. A gravidade da doença também esta relacionada com as propriedades do aminoácido que substitui a glicina.

O colágeno é uma proteína extracelular pouco solúvel em água e organizada em fibras de grande resistência. Cada molécula de colágeno é constituída de três cadeias polipeptídicas (uma *tripla hélice*) enroladas uma em torno da outra e orientadas para a direita com cerca de 1.000 resíduos de aminoácidos cada uma.

A estrutura primária das cadeias polipeptídicas do colágeno (com exceção de 15 a 25 aminoácidos nos terminais $–NH_2$ e –COOH) é constituída de glicina (~33% do total), de prolina (~10%) e 4–hidroxiprolina (~10%), constituindo tripletes da seqüência repetida $(Gly–X–Y)_n$, em que X e Y são freqüentemente prolina e hidroxiprolina. A 5–hidroxilisina e a 3–hidroxiprolina também estão presentes em pequenas quantidades. Alguns resíduos de hidroxilisina do colágeno estão ligados a carboidratos simples por meio de sua hidroxila formando *glicoproteínas.* Os componentes carboidratos do colágeno são necessários para a *fibrilogênese,* associação de fibras de colágeno em suas localizações extracelulares, como os tendões e ossos.

As três cadeias polipeptídicas entrelaçam-se para formar uma tríplice hélice à direita estabilizada por pontes de hidrogênio formadas entre as cadeias polipeptídicas individuais (entre o NH da glicina de uma cadeia e a C=O da prolina ou de outro aminoácido em outra cadeia) constituindo o módulo estrutural básico do colágeno, chamado *tropocolágeno.*

A síntese do colágeno ocorre inicialmente no retículo endoplasmático, depois no aparelho de Golgi e, finalmente, no espaço extracelular. A cadeia nascente polipeptídica, chamada pré–procolágeno, sofre modificação pós–transducional fornecendo o procolágeno. Modificações pós-translacionais adicionais envolvem a hidroxilação, a oxidação, a condensação aldólica, redução e glicolisação. Pela ação de hidrolases (*prolil–hidroxilase* e *lisil–hidroxilase*) são adicionados grupos hidroxila aos resíduos de prolina e lisina da cadeia em reações que requerem *ácido ascórbico* (vitamina C).

Na deficiência de vitamina C, o tropocolágeno não forma as ligações cruzadas covalentes. O resultado é o *escorbuto,* uma doença nutricional cujos sintomas são: descolorações da pele, fragilidade dos vasos sangüíneos, hemorragia gengival e, em casos extremos, a morte.

Quadro 2.6 Príon proteína

A *encefalopatia espongiforme bovina* ("doença da vaca louca"), "scrapie" em ovelhas, a *síndrome de Creutzfeldt–Jacob* e a *kuru* em humanos – são doenças causadas por uma proteína conhecida como *príon–proteína celular* (PrPC). A príon–proteína (agentes infecciosos proteináceos) é componente das células cerebrais normais onde se encontra fundamentalmente na conformação α–hélice. Em tecidos doentes, a forma infecciosa da proteína príon apresenta-se como uma mistura de α–hélice e folhas β pregueadas (PrPSc), produzindo agregados fibrosos que danificam as células cerebrais. As doenças por príons derivados de PrPSc podem ser de origem genética ou infecciosa.

A proteína é encontrada principalmente na superfície externa de neurônios, mas sua função ainda é desconhecida.

Mutações nos genes humanos PrPc parecem ser responsáveis por doenças inerentes da príon–proteína, por exemplo, a doença de Gerstmann–Sträussler–Scheinker e insônia familiar fatal. Mais de 18 diferentes mutações já foram identificadas.

O príon foi descoberto pelo Dr. Stanley B. Prusiner, o qual recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia em 1997.

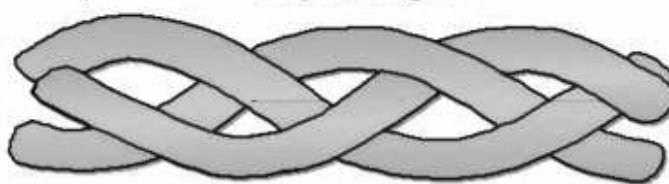



Figura 2.11
Representação do modelo de colágeno

As ligações cruzadas covalentes formadas dentro e entre as hélices do tropocolágeno, aumentam a resistência tensional dessas estruturas. As ligações cruzadas são obtidas a partir da lisina em duas fases:

- O grupo ε–amino da lisina ou da hidroxilisina é oxidado pela lisil-oxidase para formar *alisina* um aminoácido contendo o grupo R aldeído.
- O grupo aldeído da alisina reage com o grupo ε-amino de outro resíduo de lisina de um filamento adjacente para produzir uma ligação cruzada estável. Alternativamente, dois resíduos de alisina reagem por condensação aldólica para formar outra ligação cruzada.

Fibras de colágeno

A biossíntese das cadeias de tropocolágeno e sua associação em microfibrilas do colágeno ocorre a partir de moléculas precursoras chamadas pró-colágenos que são processadas pela remoção dos aminoterminais e carboxi-terminal por meio de proteólise seletiva.

As três cadeias polipeptídicas que compõem o colágeno são denominadas cadeias α. Essas cadeias combinadas em uma estrutura em tripla hélice formam os vários tipos de colágeno presentes nos tecidos. O colágeno tipo I, o mais abundante (90% do colágeno total), é formado por duas cadeias polipeptídicas α_1 e uma cadeia α_2 que formam uma hélice tríplice. Alguns tipos de colágeno são mostrados na Tabela 2.3.

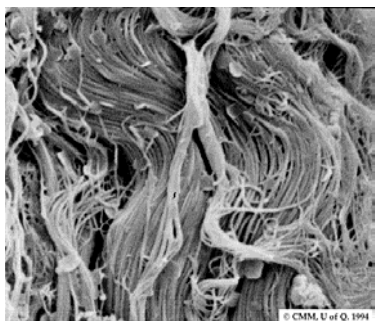



Tabela 2.3 Alguns tipos de colágeno mais abundantes

Tipo	Composição	Distribuição nos tecidos
I	$(\alpha_1)_2\ \alpha_2$	Tendões, pele, ossos, córnea, vasos sangüíneos
II	$(\alpha_1)_3$	Cartilagem, disco intervertebral, humor vítreo
III	$(\alpha_1)_3$	Pele fetal, vasos sangüíneos, órgãos internos
IV	$(\alpha_1)_2\ \alpha_2$	Membrana basal
V	$(\alpha_1)_2\ \alpha_2$	Pele, placenta, vários tecidos

B. α-Queratinas

As α–*queratinas* são proteínas constituídas quase exclusivamente de α–hélices compostas de três cadeias polipeptídicas enroladas em forma de corda helicoidal resistente ao estiramento. São ricas em resíduos de cisteína que formam pontes covalentes de dissulfeto que estabilizam as cadeias polipeptídicas adjacentes. Apresentam também teores importantes de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos alanina, valina, isoleucina, fenilalanina e metionina.

As α–queratina*s* formam a proteína da pele, cabelo, unhas, chifres, penas e lã. O cabelo é constituído de células mortas.

C. Fibroína da seda

Muitos insetos e aranhas produzem seda, uma estrutura que consiste da proteína fibrosa fibroína embebida em uma matriz amorfa. Na fibroína, considerada uma β–queratina, as cadeias polipeptídicas são arranjadas na conformação de folhas β–antiparalela. As folhas β são formadas porque a fibroína tem elevado conteúdo de aminoácidos com grupos R relativamente pequenos como a glicina, alanina ou serina. A seda é uma fibra resistente por estar quase completamente distendida. Para esticá-la mais, seria necessário romper as ligações covalentes de suas cadeias polipeptídicas. No entanto, a flexibilidade da seda é ocasionada pelo deslizamento das folhas β adjacentes que estão associados por forças de van der Waals.

2.9 Proteínas globulares

As *proteínas globulares* possuem cadeias polipeptídicas enoveladas firmemente em estruturas tridimensionais compactas com forma esférica ou elipsóide. Suas massas moleculares são variáveis enquanto a solubilidade em água é relativamente elevada pois as cadeias laterais hidrofóbicas (insolúveis em água) dos aminoácidos (fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina e valina) estão orientados para o interior das estruturas, enquanto os grupos polares hidrófilos (arginina, histidina, lisina, ácido aspártico e ácido glutâmico) estão situados na área externa. Os aminoácidos com grupos polares não–carregados (serina, treonina, asparagina, glutamina e tirosina) estão tanto na superfície externa da proteína, como no interior da molécula. As proteínas globulares exercem diferentes tipos de atividades biológicas, tais como: enzimas,

transportadores e moduladores fisiológicos e genéticos. Os exemplos típicos são: a mioglobina, a hemoglobina e os anticorpos.

Proteína globular com estrutura α-hélice e folha β pregueada.

A. Mioglobina

A mioglobina presente no citosol das células musculares, é uma proteína transportadora e armazenadora de oxigênio nos músculos esqueléticos e cardíacos dos vertebrados. A mioglobina liga o oxigênio liberado pela hemoglobina nos capilares e posteriormente difundido através das membranas celulares. Formada por uma única cadeia polipeptídica de 153 resíduos de aminoácidos e um grupo prostético *heme* (anel heterocíclico porfirínico contendo quatro anéis pirrólicos e um átomo de Fe^{2+}). Não possui resíduos de cisteína e, portanto, não apresenta ligações dissulfeto. As características fundamentais da estrutura da mioglobina são:

- É uma proteína globular com dimensões aproximadas de 4,5 x 3,5 x 2,5 nm.
- A superfície da molécula é polar e seu interior apolar. Os aminoácidos polares da cadeia polipeptídica contribuem para a alta solubilidade da molécula.
- O interior da molécula é compacto e consiste quase inteiramente de resíduos de aminoácidos não-polares (leucina, valina, metionina e fenilalanina) e é desprovido de resíduos de aminoácidos com carga, tais como, aspartato, glutamato, lisina e arginina. Os únicos resíduos polares no interior são dois resíduos de histidina, que atuam na ligação do ferro e oxigênio.
- Resíduos de aminoácidos polares e não-polares (ex.: treonina e tirosina) estão orientados com sua porção não-polar para o interior da molécula.
- Composta por oito regiões α-hélice conectadas por dobras formadas por aminoácidos desestabilizadores designados A–H , que constituem 75% da cadeia. Cada aminoácido da cadeia é

codificado, ex.: His F8 refere-se ao oitavo resíduo da hélice F (Figura 2.12).

- A cadeia contém um total de sete segmentos não-helicoidais: cinco deles no interior das regiões helicoidais e designados de acordo com as hélices que eles interrompem.
- A ocorrência de prolina interrompe as α–hélice. Existem quatro resíduos de prolina na mioglobina.

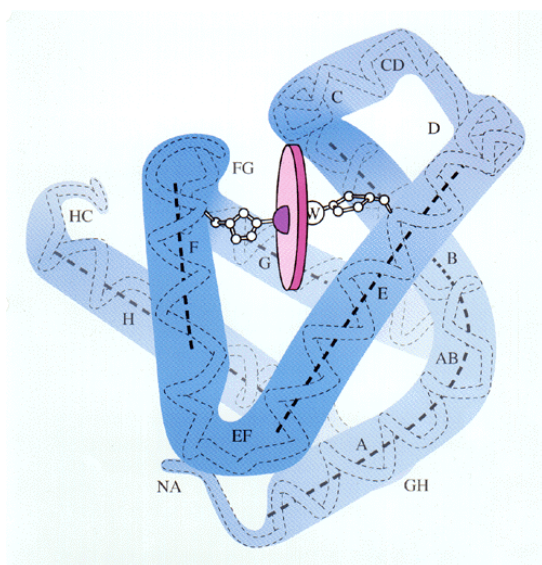



Figura 2.12
Estrutura da molécula de mioglobina. O esqueleto peptídico é constituído por oito α-hélices marcadas por letras, de A a H.

B. Hemoglobina

A hemoglobina é uma proteína tetramérica presente nas hemáceas cuja principal função é o transporte do oxigênio dos pulmões aos tecidos periféricos. A hemoglobina também transporta CO_2 e prótons, dos tecidos periféricos aos pulmões, para subseqüente excreção.

A hemoglobina normal de adulto, a HbA consiste de quatro cadeias polipeptídicas: duas α (cada uma com 141 resíduos de aminoácidos) e duas β (cada uma com 146 resíduos de aminoácidos) representada por $\alpha_2\beta_2$ e estabilizadas por pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas. Outra forma encontrada em baixos teores (1 a 3,5% do total) no adulto é a HbA_2 composta por cadeias $\alpha_2\delta_2$. A HbF formada por $\alpha_2\gamma_2$ predomina no feto, em 60 a 90% no recém-nascido e <1% após um ano. A hemoglobina H formada por quatro cadeias β, produzida quando faltam cadeias α para a síntese de HbA. A hemoglobina de Bart constituída de tetrâmero de γ, formada quando faltam cadeias α para a síntese de HbF no feto; apresenta-se em <2% no recém-nascido normal.

Cada uma das cadeias de hemoglobina contém um grupo prostético, o *heme* (molécula de *protoporfirina IX* contendo um átomo de Fe^{2+}). Nas cadeias α, o heme está encaixado entre a His–58

e a His–87, enquanto nas cadeias β, o encaixe ocorre entre a His−63 e His−92.

Com respeito à estrutura secundária, cada cadeia de hemoglobina consiste de várias regiões α–hélice separadas umas das outras por segmentos não–helicoidais. A estrutura terciária envolve várias voltas e espirais, tendo cada cadeia uma forma esferóide. Apesar das estruturas primárias das cadeias α e β da hemoglobina diferirem significativamente daquela da mioglobina, as conformações secundária e terciária são bastante semelhantes.

As principais características da molécula de hemoglobina são:

- Não existem ligações covalentes entre as quatro cadeias polipeptídicas, apesar da existência de dois resíduos de cisteína em cada subunidade α e um resíduo por subunidade β.
- Entre as subunidades idênticas (αα ou ββ), existem poucas interações eletrostáticas e algumas pontes de hidrogênio.
- Entre as subunidades α e β existem extensas regiões de interações eletrostáticas que produzem dois dímeros idênticos, $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$, que se movimentam juntos.

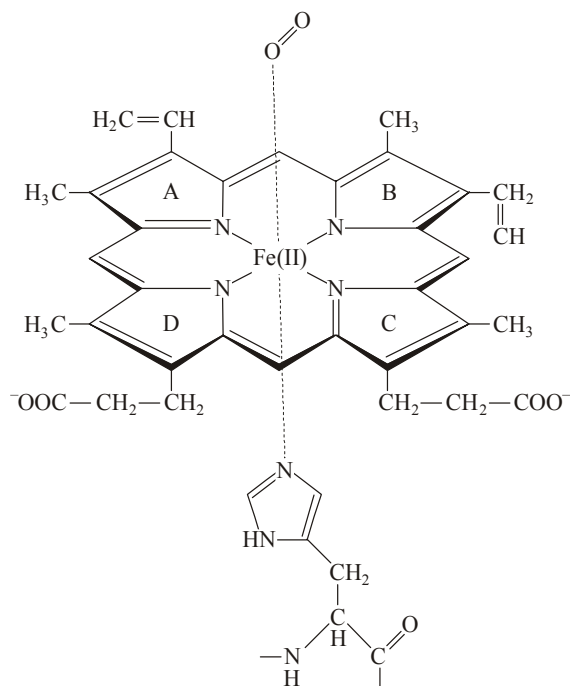



Figura 2.13
Grupo heme. O grupo heme está presente na mioglobina, hemoglobina e em hemoproteínas.

- Entre os dímeros estão presentes uma rede de interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio que se rompem e são substituídas pela formação de novas ligações no decorrer da oxigenação reversível da hemoglobina. Na oxigenação não ocorrem alterações na estrutura terciária de cada subunidade, mas as cadeias α e β sofrem alterações rotacional e posicional de

diferentes magnitudes causando um novo empacotamento das subunidades.

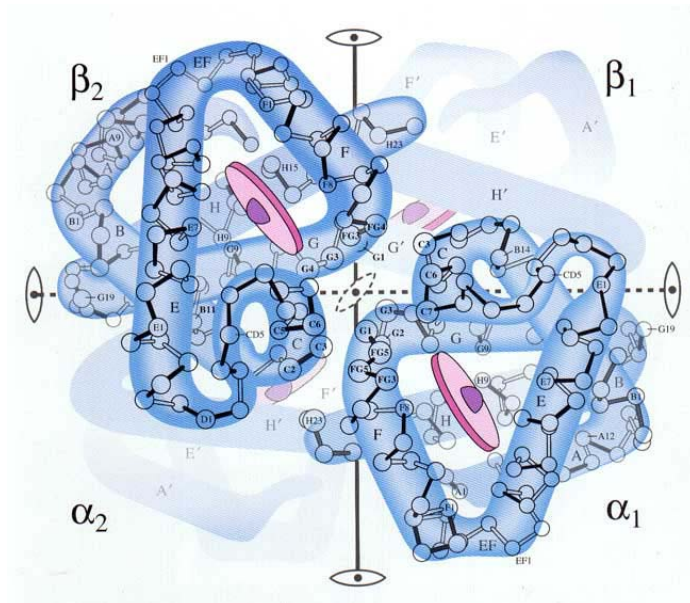



Figura 2.13
Estrutura da hemoglobina.

Em presença de oxigênio, os átomos de ferro da desoxihemoglobina se dirigem ao plano do anel heme. Esse movimento é transmitido à histidina proximal (F8), que se move em direção ao plano do anel e aos resíduos ligados. (Figura 2.14).

Hélice F
C N CH HC N
Fe
Plano da porfirina
$+O_2$
Hélice F
C N CH HC N
Fe
O O

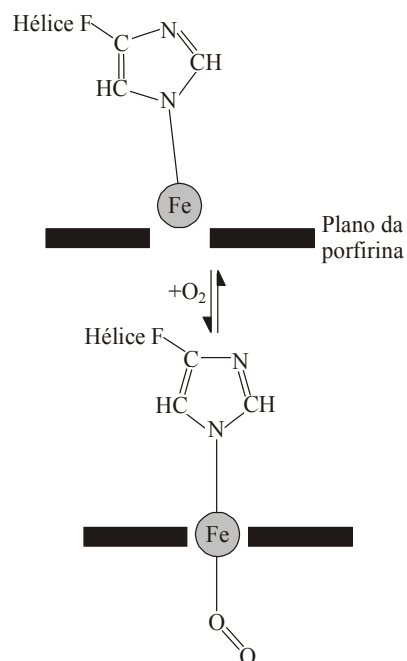



Figura 2.14
O átomo de ferro se dirige para o plano do heme oxigenado. A histidina F8 é atraída junto com o átomo de ferro.

Enquanto a mioglobina apresenta grande afinidade pelo oxigênio, a *hemoglobina* demonstra uma afinidade inicial lenta que se torna progressivamente mais rápida. Esse fenômeno é conhecido como *interação cooperativa,* uma vez que a ligação do primeiro O_2 à desoxi–hemoglobina facilita a ligação de O_2 às outras subunidades na molécula. De modo inverso, a dissociação do primeiro O_2 da hemoglobina completamente oxigenada, $Hb(O_2)_4$, tornará mais fácil a dissociação de O_2 das outras subunidades da molécula. A oxigenação da hemoglobina é acompanhada por mudanças conformacionais nas proximidades do grupo heme. A estrutura quaternária da hemoglobina desoxigenada (desoxi–Hb) é descrita como *estado conformacional T* (tenso) e aquela da hemoglobina oxigenada (oxi–Hb) como *estado conformacional R* (relaxada). A afinidade do O_2 é mais baixa no estado T e mais alta no estado R.

Em função da cooperatividade em associação e dissociação do oxigênio, a curva de saturação de oxigênio para a hemoglobina difere da observada para a mioglobina (Figura 2.15)

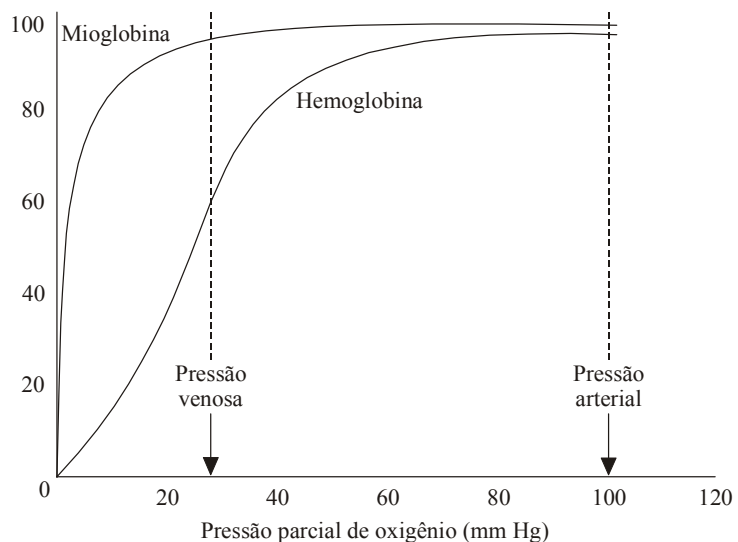
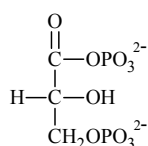



Figura 2.15
Curva de ligação da mioglobina e hemoglobina pelo oxigênio. A forma hiperbólica da curva de ligação da mioglobina representa a ligação simples de uma molécula pequena a uma proteína. A ligação do oxigênio à hemoglobina segue uma curva sigmóide característica de uma interação cooperativa entre os sítios de ligação.

Além das modificações estruturais de proteínas causadas pela oxigenação/desoxigenação, a ligação do O_2 à hemoglobina é afetada por substâncias chamadas efetores alostéricos (*ver* Capítulo 3: Enzimas): CO_2, H^+ e 2,3–bifosfoglicerato (2,3–BPG).

1. Efeito do 2,3–bifosfoglicerato (2,3–BPG). O 2,3–BPG, sintetizado a partir de um intermediário da via glicolítica (o 1,3–bifosfoglicerato), é um importante modulador da ligação do

oxigênio à hemoglobina. Nos tecidos periféricos, a deficiência de oxigênio determina acúmulo de 2,3–DPG. Nos eritrócitos, o 2,3–BPG liga-se fortemente a desoxiemoglobina e fracamente a oxiemoglobina atuando como um efetor alostérico negativo. Assim, o BPG reduz a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio através da ligação com a desoxiemoglobina, mas não à oxiemoglobina.

O
||
C—OPO_3^{2-}
|
H—C—OH
|
$CH_2OPO_3^{2-}$

2,3-Bifosfoglicerato

A concentração do 2,3–BPG nos eritrócitos é sensível a várias condições fisiológicas e patológicas. Os níveis de 2,3–BPG estão elevadas na privação crônica de O_2 nos tecidos como acontece em algumas anemias, insuficiências cardíacas e na adaptação a altitudes elevadas. Desse modo, ocorre a maior estabilização do estado T desoxigenado, provocando a liberação de mais oxigênio para os tecidos hipóxicos. (Figura 2.16).

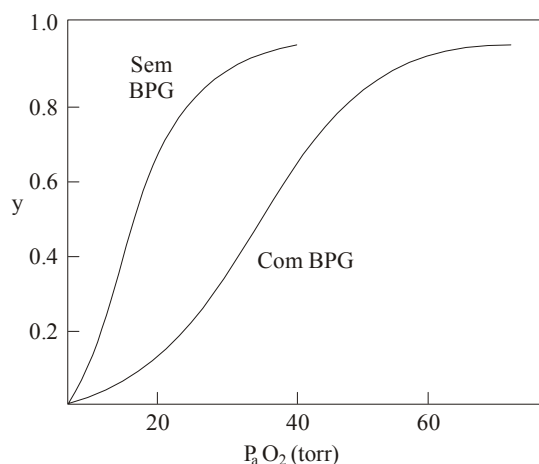



Figura 2.16
Efeito do BPG sobre a ligação do oxigênio à hemoglobina. A hemoglobina sem BPG tem maior afinidade pelo O_2 do que a hemoglobina com BPG.

2. Efeito de Bohr. A combinação da hemoglobina com O_2 também depende do pH, um fenômeno conhecido como *efeito de Bohr*. Teores elevados de íon hidrogênio (pH reduzido) favorecem a liberação de O_2; o inverso também é verdadeiro. O efeito de Bohr possui considerável importância fisiológica no transporte de O_2 dos pulmões para os tecidos e no transporte do CO_2 dos tecidos periféricos para os pulmões. À medida que o sangue atinge os tecidos, o CO_2 difunde-se para os eritrócitos, reduzindo o pH e a afinidade da hemoglobina pelo O_2, realizando a reação $H^+ + HbO_2 \rightarrow O_2 + HHb^+$. Nos pulmões, a perda de CO_2 eleva o pH e aumenta a afinidade da hemoglobina pelo O_2.

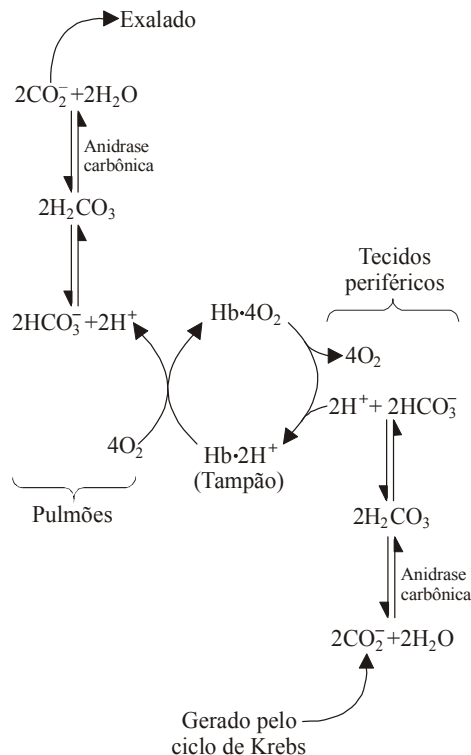



Figura 2.17
Efeito de Bohr. O CO_2 produzido nos tecidos periféricos se combina com a água com a formação de ácido carbônico que se dissocia nos íons bicarbonato e hidrogênio. A hemoglobina desoxigenada funciona como tampão se ligando a prótons e os liberando nos pulmões. Nos pulmões, o oxigênio ligado à hemoglobina provoca a saída dos prótons da hemoglobina. Os prótons se combinam com o íon bicarbonato produzindo ácido carbônico que, em presença de anidrase carbônica, produz o dióxido de carbono, posteriormente exalado pelos pulmões. A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio aumenta com o aumento do pH.

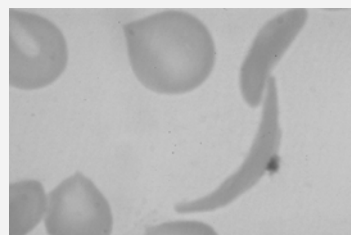
3. Efeito do CO_2. Células metabolicamente ativas produzem elevados teores de CO_2. Concentrações elevadas de CO_2 reduzem a afinidade da hemoglobina pelo O_2. O CO_2 reage transitoriamente com grupos α–amino N–terminais das cadeias polipeptídicas da hemoglobina para formar carbamino–hemoglobina que transporta o CO_2 para os pulmões para a sua eliminação.

Hemoglobinopatias

Mais de 600 variantes genéticas da seqüência dos aminoácidos da hemoglobina de adultos normais (HbA) foram relatadas. Essas moléculas, em cerca de 95% dos casos, são resultado da substituição de um único aminoácido nas cadeias α ou β durante o processo de síntese protéica. Outras variantes podem ser devidas a inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos que modificam a matriz de leitura dos códons durante a síntese protéica. Algumas hemoglobinas variantes causam doenças debilitantes dependendo da natureza e posição da substituição. Várias mutações desestabilizam as estruturas terciárias e quaternárias modificando a afinidade da hemoglobina pelo O_2.

Quadro 2.7 Anemia falciforme

A anemia falciforme é uma *síndrome falcêmica* caracterizada pela presença de hemoglobina S nos eritrócitos. Na hemoglobina S (de *Silckle*), é uma forma variante da hemoglobina adulta normal (HbA_1) em que ocorre a substituição do glutamato, na posição 6 da cadeia β de HbA_1 pela valina. Ou seja, o glutamato de cadeia lateral polar é substituído pela valina apolar. O novo arranjo permite a interação hidrofóbica com a fenilalanina β^{85} e leucina β^{88} de uma desoxi HbS adjacente. As moléculas se agregam com a formação de polímeros com outras moléculas de conformação desoxi da HbS, produzindo longos precipitados fibrosos (280 milhões em cada eritrócito) que, por sua vez, deformam os eritrócitos (forma de foice), resultando em alta velocidade de hemólise. Apenas indivíduos homozigóticos para HbS apresentam a doença. Em indivíduos com duas cópias do gene mutante (homozigóticos), os drepanócitos interagem para formar agregados que podem obstruir os vasos capilares reduzindo o fluxo normal de sangue. O bloqueio da microcirculação ocorre em qualquer parte do organismo; nos glomérulos, causam glomerulite focal e hematúria. A remoção aumentada de eritrócitos falciformes promove anemia. A expectativa de vida de um homozigótico é menor que 30 anos.

A mutação, entretanto, confere maior resistência dos eritrócitos com HbS ao *Plasmodium falciparum* (protozoário transmitido por mosquito e responsável pela malária) que necessita dos eritrócitos do hospedeiro durante parte do seu ciclo de vida. Células falciformes, devido a sua fragilidade, são removidas da circulação sangüínea mais rapidamente que as hemácias normais e o parasito não completa esse estágio do seu desenvolvimento. Parasitas existentes nessas células são também destruídos pela atividade esplênica.

As anormalidades da síntese da hemoglobina são as doenças genéticas mais comuns em todo o mundo e são divididas em três grupos:

- *Hemoglobinopatias estruturais.* São defeitos genéticos em que há troca de aminoácidos na seqüência das cadeias globínicas da hemoglobina. Ex.: hemoglobina S (caracteriza a anemia de células falciformes), microdrepanocitose, hemoglobinopatia SC, hemoglobinopatia C, hemoglobinopatia D, hemoglobinopatia E hemoglobinas instáveis.
- *Talassemias.* Defeitos genéticos em que há redução da síntese de uma ou mais cadeias globínicas. Ex.: α−talassemias, β−talassemias, talassemia do recém-nascido e δβ−talassemia.
- *Persistência hereditária da hemoglobina fetal.* Síntese de hemoglobina fetal durante a idade adulta. Há formas homozigóticas e heterozigóticas. Os homozigóticos têm 100% de HbF, pois não sintetizam cadeias β e δ.

C. Anticorpos

Os anticorpos ou imunoglobulinas compõem uma família de glicoproteínas produzidas pelos *linfócitos B* em resposta à presença de moléculas estranhas conhecidas como antígenos (resposta imunitária humoral). As características estruturais fundamentais das imunoglobulinas são:

- As moléculas de anticorpo são glicoproteínas com quatro cadeias polipeptídicas. Cada molécula tem estrutura em Y contendo duas unidades idênticas chamadas *cadeias pesadas* (H) e duas

unidades idênticas entre si, porém de menor tamanho, denominadas *cadeias leves* (L).

- A estrutura primária das cadeias pesadas, denominadas cadeias γ, μ, α, δ e ε, é a base da classificação das imunoglobulinas em cinco classes: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. A IgG humana pode ser subdividida em quatro subclasses: IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4, enquanto a IgA em duas classes.
- As cadeias leves de cada molécula de imunoglobulina são formadas por apenas dois tipos κ e λ.
- As quatro cadeias são covalentemente interconectados por pontes dissulfeto. No interior de cada cadeia da molécula, ligações dissulfeto intercadeias dobram a molécula em uma estrutura mais compacta.
- Cada cadeia polipeptídica consiste de duas regiões *região variável* (V) e *região constante* (C) quanto à seqüência de aminoácidos, (estrutura primária). A região variável da cadeia leve (V_L) é, aproximadamente, 50% do comprimento da cadeia enquanto a região variável da cadeia pesada (V_H) é aproximadamente 25% do comprimento da cadeia.

A digestão pela papaína fornece dois fragmentos principais chamados *fragmento* F_{ab}, que retém a capacidade de ligar o antígeno da molécula intacta, e o *fragmento* F_c, que é cristalizável.

2.10 Proteínas como eletrólitos

As proteínas apresentam características ácido–base semelhantes aquelas dos aminoácidos. Com exceção dos aminoácidos N–terminal e C–terminal, os grupos α–amino e α–carboxílicos estão comprometidos nas ligações peptídicas. Os polipeptídeos possuem cargas elétricas devido principalmente aos grupos ionizáveis das cadeias laterais (R) dos resíduos de aminoácidos. Os valores de pK desses grupos nas proteínas diferem daqueles apresentados para os aminoácidos livres, pois são influenciados pela natureza dos outros resíduos presentes na vizinhança.

O pK dos grupos ionizáveis dos resíduos de aminoácidos numa cadeia polipeptídica são mostrados na Figura 2.18.

Quadro 2.8 Eletroforese das proteínas

As proteínas nos líquidos biológicos são moléculas anfóteras que podem ser separadas em frações quando aplicadas sobre um suporte poroso e submetidas a um campo elétrico em processo denominado eletroforese. A migração ocorre de acordo com o grau de ionização, tamanho e forma da molécula protéica, também como das características da solução tampão onde se realiza o processo; da força do campo elétrico; da porosidade, viscosidade e temperatura do suporte.

As frações nas quais predominam as cargas negativas, a proteína se dirige para o ânodo (pólo positivo) e as positivas, migram para o cátodo (pólo negativo). Como a carga da proteína depende da concentração do íon hidrogênio da solução, o pH deve ser especificado e mantido constante durante o procedimento.

A eletroforese é empregada em laboratório clínico para a separação das frações protéicas do soro sangüíneo (ou urina, líquido cefalorraquidiano ou outros líquidos biológicos). O soro é aplicado num suporte (papel de filtro, acetato de celulose, poliacrilamida, gel de agarose, etc) cujas extremidades estão mergulhadas numa solução tampão com pH 8,6 (neste pH predominam cargas negativas nas proteínas) que estão sob diferença de potencial elétrico. As proteínas migram e são separadas em frações.

Após a migração o suporte é corado e tornam-se visíveis seis frações: a albumina e as globulinas α_1, α_2, β_1, β_2, e γ.

O suporte corado é submetido à leitura densitométrica e é representada na forma de gráfico.

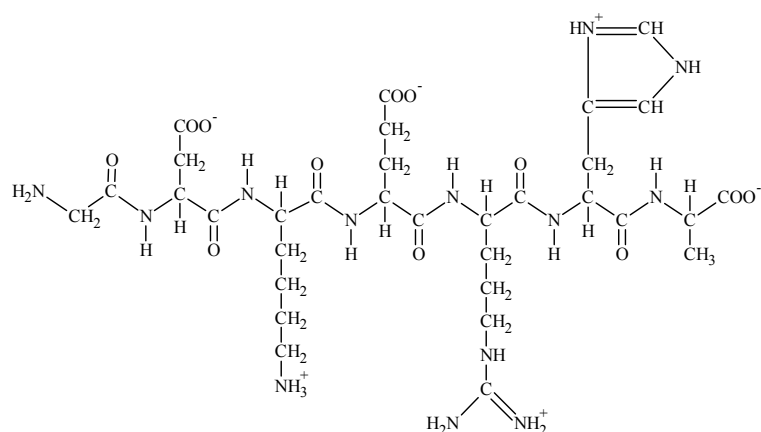
Figura 2.18
Cadeia polipeptídica hipotética contendo alguns grupos que contribuem com cargas elétricas nas proteínas.

A carga líquida de uma proteína depende do número de cadeias ionizáveis, o valor do pK e o pH do meio. O pH onde a soma cargas negativas é igual a das cargas positivas é denominado *ponto isoelétrico* (pI) da proteína. Quando submetida a um campo elétrico como na eletroforese, uma proteína em seu pI não migra em qualquer direção. O pI varia de uma proteína para outra e depende dos valores individuais de p*K* de todos os grupos ionizáveis presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos e dos extremos das cadeias polipeptídicas. Os pI das proteínas estão, geralmente, entre 4 e 7 apesar de algumas apresentarem valores fora desses limites como no caso da pepsina (pI = 1) e histona (pI = 10). Os valores de pI de algumas proteínas são mostrados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4
Valores de pI de algumas proteínas

Proteína	pI
Pepsina	1,0
Haptoglobina	4,1
Lipoproteína α_1	5,5
Globulina γ_1	5,8
Fibrinogênio	5,8
Hemoglobina	7,2
Citocromo c	10,0

Em pH maior do que o pI a proteína tem carga negativa efetiva. Em pH menor do que o pI a proteína tem carga positiva efetiva. A magnitude da carga elétrica efetiva de uma proteína e função da distância entre o pH e o pI. A albumina plasmática humana contém 585 resíduos de aminoácidos e tem pI de 4,9 (pH onde a carga líquida é zero). Em pH 8,6 vários grupos estão titulados em sua forma básica com carga líquida de –20. Por outro lado, em pH 3 a carga elétrica líquida da molécula de albumina em solução é +60.

Resumo

1. As proteínas apresentam uma elevada gama de funções nos seres vivos. Além de servir como material estrutural, as proteínas estão envolvidas na regulação metabólica, transporte, defesa e catálise. Os polipeptídeos são polímeros de aminoácidos. As proteínas consistem de uma ou mais cadeias polipeptídicas.
2. Cada aminoácido contém um átomo de carbono central (o carbono α) no qual estão ligados um grupo amino, um grupo carboxílico, um átomo de hidrogênio e um grupo R. Além de formar proteínas, os aminoácidos tem outros papéis biológicos. De acordo com sua capacidade de interagir com a água, os aminoácidos são separados em quatro classes: (1) não−polar ou neutra, (2) polar e neutra, (3) ácida e (4) básica.
3. A titulação de aminoácidos e peptídeos ilustra o efeito do pH sobre suas estruturas. O pH em que a molécula não apresenta carga elétrica líquida é chamado ponto isoelétrico.
4. Os aminoácidos sofrem duas reações de particular importância: a formação da ligação peptídica e a oxidação da cisteína.
5. As proteínas também são classificadas de acordo com sua conformação e composição. As proteínas fibrosas (exemplo, o colágeno) são longas, moléculas enoveladas insolúveis em água e fisicamente rígidas. As proteínas globulares (exemplo, a hemoglobina) são moléculas compactas e esféricas quase sempre solúveis em água.
6. Existem quatro níveis estruturais das proteínas. A estrutura primária é a seqüência de aminoácidos determinada por informação genética. Os arranjos regulares e recorrentes da cadeia polipeptídica constituem a estrutura secundária das proteínas. O pregueamento não−periódico da cadeia polipeptídica forma a estrutura tridimensional das proteínas. As proteínas que consistem de dois ou mais polipeptídeos formam complexos tridimensionais denominados estruturas quaternárias. Várias condições físicas e químicas podem romper a estrutura das proteínas. Agentes desnaturantes incluem ácidos ou bases fortes, agentes redutores, metais pesados, mudanças da temperatura e estresse mecânico.

Referências

BLACKSTOCK, J. C, **Biochemistry.** Oxford: Butterworth, 1998. p. 47-75.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica.** 3 ed. Porto Alegfre: ArtMed, 2000. p. 94-155.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger: Princípios de bioquímica.** 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 87-188.

McKEE, T., McKEE, J.R. **Biochemistry:** The molecular basis of live. 3 ed. New York: McGraw-Hill, 2003. p. 108-160.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório:** princípios e interpretações. 4 ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. p. 75-103.

Capítulo

3

VALTER T. MOTTA

BIOQUÍMICA BÁSICA

Enzimas

3

Enzimas

Objetivos

1. Compreender a sistematização da nomenclatura enzimática.
2. Descrever as classes enzimáticas: hidrolase, transferase, isomerase, liase, ligase e oxirredutase.
3. Descrever a função de coenzimas e co-fatores na biocatálise.
4. Conceituar energia livre de ativação e correlacionar com a atividade enzimática.
5. Conceituar sítio ativo de uma enzima e correlacionar com atividade enzimática.
6. Conceituar número de renovação (turnover) e reconhecer sua significação biológica.
7. Conceituar especificidade enzimática e reconhecer sua significação biológica.
8. Descrever o efeito da temperatura e pH sobre a velocidade da reação enzimática.
9. Descrever o efeito da variação da concentração do substrato na velocidade da reação enzimática e indicar o significado do Km.
10. Descrever as semelhanças e diferenças entre inibição enzimática competitiva, não-competitiva e incompetitiva ao nível de sítio ativo.
11. Descrever a regulação alostérica e seus efeitos.
12. Reconhecer que o caráter sigmoidal da curva de substrato de uma proteína alostérica, depende da interação entre as subunidades e é modificado pela interação da proteína com o efetor.

A vida depende de uma bem orquestrada série de reações químicas. Muitas delas, entretanto, ocorrem muito lentamente para manter os processos vitais. Para resolver esse problema, a natureza planejou um modo de acelerar a velocidade das reações químicas por meio da catálise. As ações catalíticas são executadas por enzimas que facilitam os processos vitais em todas as suas formas, desde os vírus até os mamíferos superiores.

Quadro 3.1 Natureza química das enzimas

A palavra *enzima* foi introduzida por Kuhne em 1878 para designar a ocorrência no levedo de algo responsável pela sua atividade fermentativa. Berzelius, 50 anos antes, tinha reconhecido a presença de fermentos de ocorrência natural que promoviam reações químicas e antecipou o conceito de catalisadores biológicos. Berzelius classificou os fermentos em "organizados" e "não-organizados" com base na presença ou ausência de microorganismos intactos. Kuhne aplicou a palavra enzima aos fermentos derivados de extratos de levedos, i.e. "fermentos não-organizados".

Em 1897, Büchner preparou um filtrado de extratos de levedo que foi o primeiro extrato enzimático removido de células vivas que pode catalisar a fermentação.

A natureza química das enzimas permaneceu controversa. Em 1926, Sumner cristalizou a *urease* a partir de extratos de feijão, no entanto, a preparação tinha pequena atividade catalítica e outros investigadores atribuíram o efeito catalítico a contaminantes e não à proteína. Willstätter, por outro lado, prurificou a *peroxidase* com elevada capacidade catalítica e ausência de outras proteínas. No início dos anos 30, Northrop e cols. cristalizaram a pepsina e a tripsina demonstrando definitivamente que as enzimas eram proteínas.

As *enzimas* são proteínas com a função específica de acelerar reações químicas que ocorrem sob condições termodinâmicas não–favoráveis. Elas aceleram consideravelmente a velocidade das reações químicas químicas em sistemas biológicos quando comparadas com as reações correspondentes não–catalisadas. Para ser classificada como enzima, uma proteína deve:

- Apresentar extraordinária eficiência catalítica.
- Demonstrar alto grau de especificidade em relação a seus substratos (reagentes) e aos seus produtos.
- Acelerar a velocidade das reações em 10^6 a 10^{12} vezes mais do que as reações correspondentes não-catalisadas.
- Não ser consumida ou alterada ao participar da catálise.
- Não alterar o equilíbrio químico das reações.
- Ter sua atividade regulada geneticamente ou pelas condições metabólicas.

Tabela 3.1 – Velocidade de reações não–catalisadas e catalisadas por enzimas

Enzima	Não–catalisada (s^{-1})	Catalisada (s^{-1})	Aumento da velocidade
Anidrase carbônica	$1,3 \times 10^{-1}$	1.000.000	$7,7 \times 10^{6}$
Adenosina–deaminase	$1,8 \times 10^{-10}$	370	$2,1 \times 10^{12}$
Nuclease estafilocócica	$1,7 \times 10^{-13}$	95	$5,6 \times 10^{14}$
Triose–fosfato–isomerase	$4,3 \times 10^{-6}$	4.300	$1,0 \times 10^{9}$
Quimiotripsina	$1,0 \times 10^{-9}$	190	$1,7 \times 10^{11}$
Orotidina–descarboxilase	$2,8 \times 10^{-16}$	39	$1,4 \times 10^{17}$

s^{-1} = unidade da constante de velocidade de reação de primeira ordem

Quadro 3.2 Uso industrial das enzimas

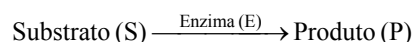
A indústria biotecnológica produz várias enzimas para diferentes usos.

O uso de *proteases* em detergentes melhora a remoção de manchas de origem biológica, como o sangue e molhos. O termo "biológico" empregado nas embalagens de sabão em pó reflete a presença de proteases. As proteases são também utilizadas em restaurantes para amaciar a carne, por cervejeiros para eliminar a turvação nas cervejas, por padeiros para melhorar a textura do pão e em indústrias de luvas para amaciar o couro.

Outras enzimas também apresentam uso industrial. Por exemplo, a *lipase* é adiconada a líquidos detergentes para degradar graxas (lipídeos) e em alguns queijos para desenvolver aroma. A *pectinase* é usada na indústria de geléias para promover a máxima extração de líquido das frutas. As *amilases* são empregadas para degradar o amido em certos removedores de papel de parede para facilitar a sua retirada.definitivamente que as enzimas eram proteínas.

As proteínas não são únicas substâncias com propriedades catalíticas nos sistemas biológicos. Alguns RNA, denominados *ribozimas*, também executam essa função.

A reação catalisada por enzima pode ser esquematizada como segue:

$$\text{Substrato (S)} \xrightarrow{\text{Enzima (E)}} \text{Produto (P)}$$

A molécula sobre a qual a enzima atua é o *substrato* (S) que se transforma em *produto* (P) da reação. Na ausência de enzima pouco produto (ou nenhum) é formado, mas em presença da mesma, a reação se processa em alta velocidade. Como a maioria das reações é reversível, os produtos da reação numa direção tornam-se substratos para a reação inversa.

As enzimas são os catalisadores mais específicos que se conhece, tanto para o substrato como para o tipo de reação efetuada sobre o substrato. A especificidade inerente da enzima, reside em uma cavidade ou fenda de ligação do substrato, que está situada na superfície da proteína enzimática. A cavidade, denominada *sítio ativo,* é um arranjo de grupos presentes em cadeias laterais de certos aminoácidos que ligam o substrato por ligações não-covalentes. Muitas vezes, os resíduos de aminoácidos que formam o sítio ativo ficam em regiões distantes, na seqüência primária, mas próximos no sítio ativo, pelo enovelamento de cadeia polipeptídica (estrutura terciária).

Algumas enzimas têm outra região na molécula, o *sítio alostérico,* afastada do sítio ativo. No sítio alostérico moléculas pequenas específicas se ligam e causam alterações na conformação protéica que afetam o sítio ativo, aumentando ou reduzindo a atividade enzimática.

A maioria das enzimas necessitam de moléculas orgânicas ou inorgânicas pequenas, essenciais à sua atividade e denominadas *coenzimas* e *co-fatores.*

3.1 Classificação das enzimas

Com a descoberta de grande número de enzimas, houve a necessidade de sistematização da nomenclatura. A *União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular* (IUBMB) adotou um sistema racional e prático de nomenclatura identificando as enzimas em seis classes, de acordo com a natureza da reação química que catalisam. Para cada enzima, são atribuídos dois nomes e um número de classificação de quatro dígitos que identificam as classes, as subclasses e as sub-subclasses.

Na classificação internacional sistemática, as enzimas são divididas em seis grupos de acordo com o tipo de reação catalisada (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Classificação das enzimas

Classe da enzima	Tipo de reação catalisada
Oxidorredutases	Reações de oxidação–redução
Transferases	Transferência de grupos funcionais
Hidrolases	Reações de hidrólise
Liases	Remoção de grupos para formar ligações duplas
Isomerases	Isomerização
Ligases	Formação de ligações entre duas moléculas

Por exemplo, a enzima glicose−6−fosfatase (nome trivial), tem como nome sistemático *D-Glicose−6−fosfato fosfohidrolase* e *número de classificação* EC 3.1.3.9. Os números representam a classe (3, hidrolase), subclasse (1, atua sobre ligações éster), sub−subclasse (3, fosforil monoéster hidrolase) e seu número de série dentro da sub-subclasse (9). A sigla "EC" é a abreviatura de *Enzyme Comission*).

Muitas enzimas de uso rotineiro são designadas pelo nome alternativo ou trivial. Por exemplo, algumas são denominadas pela incorporação do sufixo *−ase* ao nome do substrato sobre os quais elas atuam; por exemplo, a enzima que hidrolisa a *uréia* é denominada ure*ase*; o amido, a amil*ase*; ésteres do fosfato, as fosfat*ase*s. Outras são designadas pelo tipo de ação catalítica que realizam, tais como, *anidrase* carbônica; D−amino *oxidase*; lactato *desidrogenase*. Algumas levam nomes vulgares como a tripsina, pepsina, emulsina, etc.

Quadro 3.3 Enzimas usadas como agentes terapêuticos

Algumas enzimas são empregadas como agentes terapêuticos no tratamento de diferentes doenças. As *proteases, amilases* e *lípases* são usadas para auxiliar a digestão.

A *asparaginase* é usada no tratamento da *leucemia linfocítica aguda.* As células normais são capazes de sintetizar asparagina enquanto certas células tumorais, inclusive as leucêmicas, não produzem o derivado do aminoácido. A administração intravenosa de asparaginase reduz o nível plasmático de asparagina e, assim, diminui o desenvolvimento de células leucêmicas.

A *desoxiribonuclease* (DNase) é útil no tratamento da *fibrose cística*. A principal característica da fibrose cística são as infeções respiratórias recorrentes, particularmente devido a *Pseudomonas aeroginosa,* o que resulta em grandes quantidades de DNA proveniente das bactérias destruídas e morte das células fagocíticas do sistema imune. O DNA contribui para a viscosidade do muco que provoca sintomas aflitivos. A DNase é usada para degradar o DNA e diluir o muco.

A *estreptocinase* é empregada na remoção de coágulos sangüíneos no infarto do miocárdio e nas extremidades dos membros inferiores. Ativa a transformação da proenzima fibrinolítica *plasminogênio* à *plasmina*, uma enzima que quebra a fibrina insolúvel do coágulo sangüíneo.

3.2 Co-fatores metálicos e coenzimas

Algumas enzimas são proteínas simples consistindo inteiramente de cadeias polipeptídicas, como as enzimas hidrolíticas pepsina, tripsina, lisozima e ribonuclease. Entretanto, a maioria das enzimas somente exercem sua atividade catalítica em associação com *co–fatores metálicos* e *coenzimas*.

1. Co-fatores metálicos. Os metais importantes nos organismos vivos são classificados em dois grupos: *metais de transição* (exemplo, Fe^{2+}, Zn^{2+} e Cu^{2+}) e *metais alcalinos e alcalinos terrosos* (exemplo, Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+} e Ca^{2+}). Devido a sua estrutura eletrônica, os metais de transição estão freqüentemente envolvidos na catálise.

Várias propriedades dos metais de transição os tornam essenciais para a catálise. Os íons metálicos apresentam um grande número de cargas positivas especialmente úteis na ligação de pequenas moléculas. Os metais de transição atuam como ácidos de Lewis (aceptores de pares eletrônicos), e são eletrófilos efetivos. Como suas valências permitem interagirem com dois ou mais ligantes, os íons metálicos participam na orientação apropriada do substrato para a reação. Como conseqüência, o complexo substrato-íon metálico polariza o substrato e promove a catálise. Exemplo, quando o Zn^{2+}, co–fator da anidrase carbônica, polariza uma molécula de água, forma-se um grupo OH ligado ao Zn^{2+} (função de ácido de Lewis do zinco). O grupo OH ataca nucleofilicamente o CO_2, convertendo-o em HCO_3^-.

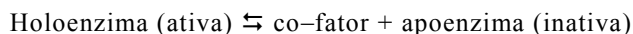
Finalmente, como os metais de transição têm dois ou mais estados de oxidação, eles podem mediar reações de oxidação–redução. Por exemplo, a oxidação reversível do Fe^{2+} para formar Fe^{3+} é importante na função do citocromo P_{450}, uma enzima microssomal que processa substâncias tóxicas.

Quadro 3.1 – Algumas coenzimas, as reações que promovem e as vitaminas precursoras

Coenzima	Reação	Fonte vitamínica
Biocitina	Carboxilação	Biotina
Coenzima A	Transferência de grupos acila	Ácido pantotênico
Cobalamina	Alquilação	Cobalamina (B_{12})
Flavina	Oxidação–redução	Riboflavina (B_2)
Ácido lipóico	Transferência de grupo acila	-
Nicotinamida	Oxidação –redução	Nicotinamida (niacina)
Fosfato de piridoxal	Transferência de grupo amino	Piridoxina (B_6)
Tetraidrofolato	Transferência de grupos de 1–carbono	Ácido fólico
Pirofosfato de tiamina	Transferência de grupo aldeído	Tiamina (B_1)
Retinal	Visão, crescimento e reprodução	Vitamina A
1, 25-diidroxicolecalciferol	Metabolismo do cálcio e fósforo	Vitamina D

2. Coenzimas. São moléculas orgânicas pequenas, frequentemente derivadas de vitaminas. Existem também certos nutrientes análogos às vitaminas (exemplo, ácido lipóico e ácido *p*–aminobenzóico) que são sintetizados em pequenas quantidades e que facilitam os processos catalisados por enzimas. Na Tabela 3.1 são listadas as coenzimas, as reações que elas participam e as fontes vitamínicas que dão origem as coenzimas.

A enzima é cataliticamente ativa quando forma um complexo denominado *holoenzima*. O componente protéico do complexo é designado de *apoenzima*.

Holoenzima (ativa) ⇆ co–fator + apoenzima (inativa)

Quadro 3.2 – Coenzimas/co-fatores metálicos e enzimas

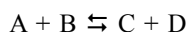
Coenzimas e co-fatores	Enzima
Coenzima	
Pirofosfato de tiamina (TTP)	Piruvato–desidrogenase
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	Monoaminooxidase
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)	Lactato–desidrogenase
Piridoxal fosfato	Glicogênio–fosforilase
Coenzima A (CoA)	Acetil–CoA–carboxilase
Biotina	Piruvato–carboxilase
Tetraidrofolato	Timidilate–sintase
Co-fator metálico	
Zn^{2+}	Anidrase–carbônica
Zn^{2+}	Carboxipeptidase
Mg^{2+}	Hexocinase

Ni^{2+}	Uréase
Mo	Nitrato–redutase
Se	Glutationa–peroxidase
Mn^{2+}	Superóxido–dismutase
K^{+}	Propionil–CoA–carboxilase

3.3 Reações catalisadas por enzimas

Para reagir, as moléculas presentes em uma solução devem colidir com orientação apropriada e com a quantidade de energia que lhes permitam formar o complexo ativado, denominado *estado de transição* que representa os reagentes em seu estado ativado. Para atingir o estado de transição, necessita-se de uma quantidade de energia definida como *energia de ativação* (E_a) ou mais comum em bioquímica *energia livre de ativação,* $\Delta G^{\ddagger}$ (o símbolo ($\ddagger$) indica o processo de ativação). Sob condições fisiológicas, a velocidade das reações pode ser aumentada pela *redução da energia livre de ativação* conseguida pela ação de *enzimas.*

A comparação do perfil energético das reações catalisadas e não-catalisadas é mostrada na Figura 3.1 para a reação:

$$A + B \leftrightarrows C + D$$

No gráfico, o estado de transição corresponde ao ponto de mais alta energia da reação não-catalisada e é a medida da *energia livre de ativação,* $\Delta G^{\ddagger}$. Ou ainda, $\Delta G^{\ddagger}$ é a energia livre do estado de transição subtraída da energia livre dos reagentes. No complexo ativado (estado de transição do sistema), os reagentes estão em forma intermediária de alta energia e não podem ser identificados nem como reagentes nem como produtos. O complexo do estado de transição pode ser decomposto em produtos ou voltar aos reagentes.

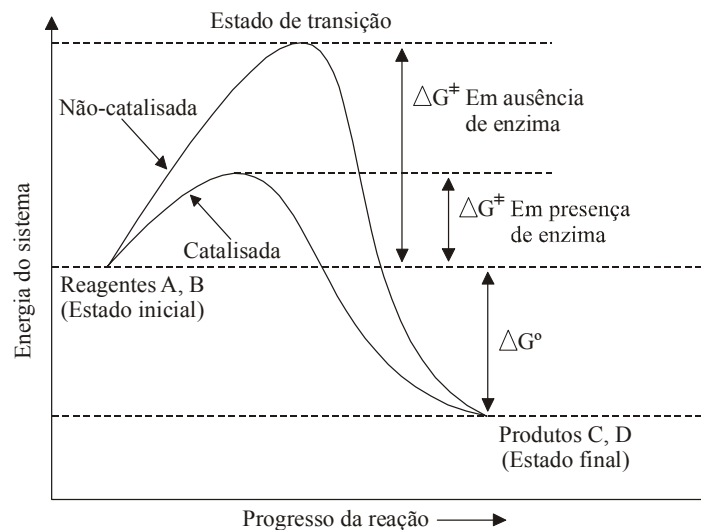



Figura 3.1
Diagrama energético de reação catalisada e de reação não-catalisada. $\Delta G^{\ddagger}$ = energia livre de ativação, ΔG^{0} = variação de energia livre. A diferença entre os valores da energia de ativação de uma reação catalisada e de uma reação não-catalisada, indica a eficiência do catalisador.

A velocidade de uma reação é inversamente proporcional ao valor de sua energia livre de ativação. Quanto maior o valor de $\Delta G^{\ddagger}$, menor será a velocidade da reação. *Os catalisadores aumentam a velocidade da reação reduzindo a energia livre de ativação.* A velocidade de uma reação pode aumentar na ordem de 10^6 a 10^{12} vezes mais do que a reação correspondente não-catalisada.

Três propriedades distintas das enzimas permitem que elas exerçam papel central na promoção e regulação dos processos celulares, caracterizando-as como componentes vitais aos sistemas vivos:

- *Elevada especificidade da reação*. Como regra geral, cada reação sob condições apropriadas é catalisada por uma enzima específica. Diante de várias rotas potencialmente possíveis, a enzima escolhe a com menor energia livre de ativação.
- *Condições reacionais mais brandas*. A atividade de cada enzima é dependente do pH, da temperatura, da presença de vários co-fatores e das concentrações de substratos e produtos.
- *Capacidade de regulação da concentração e da atividade.* Permite o ajuste fino do metabolismo em diferentes condições fisiológicas.

3.4 Sítio ativo catalítico

Sítio ativo é a região na superfície da enzima onde ocorre a catálise. O substrato liga-se ao sítio ativo por ligações não–covalentes (interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas). Os grupos que participam das ligações são: a carboxila do ácido glutâmico ou do ácido aspártico, o grupo ε-amino da lisina, o imidazol da histidina, a hidroxila da serina, etc.

Somente uma pequena porção do substrato onde ocorre transformação está ligada à enzima. Isso não implica, entretanto, que os aminoácidos no sítio ativo estejam um ao lado do outro na estrutura primária da proteína. Em conseqüência das dobras e enovelamento da enzima (estrutura secundária e terciária), certos resíduos de aminoácidos podem estar distantes um do outro na seqüência primária, ainda que juntos no sítio ativo da proteína completa.

A especificidade da ligação enzima-substrato depende do arranjo precisamente definido de átomos no sítio ativo. Uma das explicações para a elevada especificidade das enzimas é que suas estruturas tridimensionais permitem um perfeito encaixe com o substrato. Dois modelos foram propostos para explicar a especificidade enzimática, o modelo chave-fechadura e o modelo do encaixe induzido.

1. Modelo chave–fechadura. Muitas enzimas contêm fendas com dimensões fixas que permitem a inserção somente de compostos com uma dada configuração. O substrato se ajusta a esse sítio de ligação como uma chave se ajusta à sua fechadura. Substâncias que não se encaixam na fenda para formar o complexo enzima–substrato (ES), não reagem, mesmo possuindo grupos funcionais idênticos ao do substrato verdadeiro. Esse conceito é chamado *modelo chave–fechadura* proposto por Fisher em 1890.

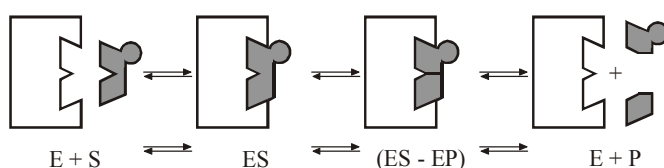



Figura 3.2
Modelo chave-fechadura. A interação entre a enzima (com estrutura rígida) e seu substrato.

2. Modelo do encaixe induzido. Um modelo mais flexível de interação enzima-substrato é o *encaixe induzido* (induced–fit) proposto por Koshland em 1958. Os sítios ativos dessas enzimas não estão completamente pré-formados e a interação inicial do substrato com a enzima induz uma alteração conformacional na enzima. Isso promove o reposicionamento dos aminoácidos catalíticos para formar

o sítio ativo e a estrutura correta para interagir com os grupos funcionais do substrato (Figura 3.3).

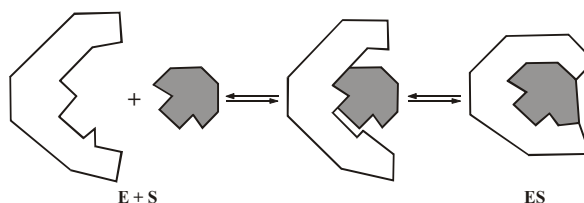



Figura 3.3
Modelo do encaixe induzido. A ligação inicial do substrato à enzima induz uma mudança conformacional na enzima produzindo um melhor encaixe.

3.5 Mecanismos catalíticos

As reações químicas envolvidas na transformação dos substratos variam com os mecanismos de ação das enzimas. Os principais tipos de mecanismos catalíticos que as enzimas utilizam são: (1) efeitos de proximidade e orientação, (2) catálise eletrostática, (3) catálise ácido-básica e (4) catálise covalente.

1. Efeitos de proximidade e orientação. Os substratos se aproximam dos grupos funcionais catalíticos da enzima em uma orientação espacial apropriada para que a reação possa ocorrer. Após o correto posicionamento do substrato, uma modificação na conformação da enzima resulta em um complexo enzima–substrato orientado. Essa orientação leva o complexo enzima–substrato ao estado de transição.

2. Catálise por íons metálicos. A força das interações eletrostáticas está relacionada com a capacidade das moléculas solventes vizinhas em reduzir os efeitos de atração entre os grupos químicos. Como a água é excluída do sítio ativo quando o substrato se liga, a constante dielétrica local é muitas vezes baixa. A distribuição de cargas nos sítios ativos das enzimas pode influenciar a reatividade química do substrato. Uma ligação mais eficiente do substrato reduz a energia livre do estado de transição, que acelera a reação.

3. Catálise ácido-básica geral. Os grupos químicos podem se tornar mais reativos pela adição ou remoção de prótons. Os sítios ativos das enzimas contêm cadeias laterais que podem atuar como doadores ou receptores de prótons. Esses grupos são denominados ácidos gerais ou bases gerais. Por exemplo, a cadeia lateral da histidina (grupo imidazol) muitas vezes atua como catalisador ácido e/ou básico em concerto porque tem pK_a na faixa de pH fisiológico.

4. Catálise covalente. Acelera a velocidade da reação pela formação de uma ligação covalente transitória entre a enzima e o substrato. Um grupo nucleofílico da cadeia lateral do catalisador

forma uma ligação covalente instável com um grupo eletrofílico do substrato. O complexo enzima–substrato então forma o produto.

A. Mecanismo de ação da lisozima

O *mecanismo de ação da lisozima* emprega tanto a distorção da cadeia polissacarídica como a catálise ácido-básica geral. A lisozima é uma enzima com cadeia polipeptídica única com 129 resíduos de aminoácidos. A lisozima, uma glicosidase, destrói as paredes das células bacterianas ao hidrolisar a ligação glicosídica entre o *N*–acetilmuramato e *N*–acetilglicosamina. A molécula da lisozima tem uma fenda, à qual os substratos se ligam por ligações pontes de hidrogênio e forças de van der Waals. O mecanismo catalítico da lisozima envolve o ácido glutâmico 35, na sua forma não-carregada, que atua como catalisador ácido para clivar o substrato polissacarídico pela doação de um H^+ ao oxigênio da ponte entre os anéis D e E. O C_1 do anel D fica, então, com carga positiva O íon axônio resultante carregado positivamente e planar, é eletrostaticamente estabilizado pelo aspartato 52 na sua forma de carboxilato. A reação é facilitada pela distorção do resíduo D na conformação planar de meia-cadeira, o que permite que a carga positiva seja compartilhada entre o C-1 e o átomo de oxigênio do anel.

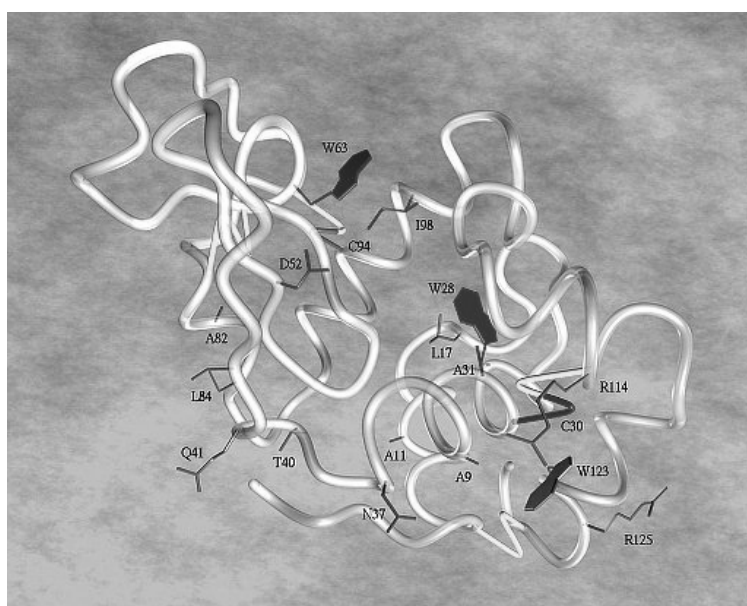



Figura 3.4
Estrutura da lisozima.

B. Mecanismo de ação das serino–proteases

As enzimas serino–proteases empregam a catálise ácido–básica geral e a catálise covalente para a sua ação. As serino–proteases são um grupo de enzimas proteolíticas que incluem a *quimotripsina, tripsina, elastase, trombina, plasmina*, e são assim chamadas por utilizar um único resíduo serina ativada no sítio ativo. As serino–proteases utilizam o grupo $–CH_2–OH$ da serina como um nucleofílico para hidrolisar cataliticamente ligações peptídicas. Formam um intermediário covalente acil–enzima, no qual o grupo carboxila do substrato é esterificado com a hidroxila da serina 195 (catálise covalente). O caráter nucleófilo da –OH é bastante acentuado pela histidina 57, que recebe um próton da serina (catálise ácido-básica geral). A histidina resultante com carga positiva é estabilizada pela interação eletrostática com a carga negativa do aspartato 102. A segunda etapa, o intermediário acil–enzima é deacilado pelo reverso das etapas anteriores.

Outras serino-proteases existem na forma precursora inativa, denominadas *zimogênios*, que são ativadas por clivagem catalítica de uma ligação poliptídica específica por outras serino-proteases.

A atividade das proteases é limitada por inibidores sintetizados pelo pâncreas e fígado. Por exemplo, se enzimas pancreáticas forem prematuramente ativadas ou liberadas do pâncreas após um trauma, elas são rapidamente inativadas por inibidores da protease. Os inibidores passam por substratos da protease, mas não são completamente hidrolizados. O desequilíbrio entre a atividade das proteases e a atividade de inibidores da protease pode provocar doenças, por exemplo, enfisema.

3.6 Fatores que influenciam a atividade enzimática

Vários fatores influenciam a atividade enzimática, incluindo a temperatura, pH, concentração do substrato, tempo e produto da reação.

A. Temperatura

As reações químicas são afetadas pela temperatura. Quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação. A velocidade aumenta porque mais moléculas adquirem energia suficiente para atingir o estado de transição. Em reações catalisadas por enzimas, a velocidade é acelerada pelo aumento da temperatura até atingir uma temperatura ótima na qual a enzima opera com a máxima eficiência. Como as enzimas são proteínas, os valores de temperatura ótima situam-se entre 40 e 45 °C e dependem do pH e da força iônica. Acima dessa temperatura, a atividade das enzimas declina adruptamente por desnaturação protéica. Sob condições de hipotermia, a atividade enzimática é deprimida. As relações acima descritas são mostradas na Figura 3.5.

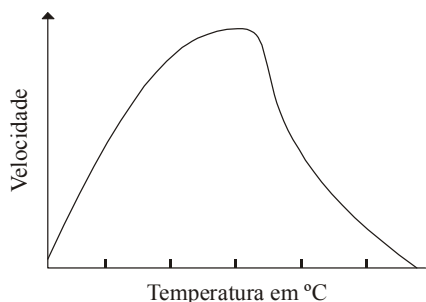



Figura 3.5
Efeito da temperatura sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima.

B. pH

A concentração de íons hidrogênio afeta as enzimas de vários modos. Primeiro, a atividade catalítica das enzimas está relacionada à ionização de aminoácidos no do sítio ativo.. Por exemplo, a atividade catalítica de certas enzimas necessita a forma protonada da cadeia lateral do grupo amino. Se o pH torna-se suficientemente alcalino de tal modo que o grupo perde seu próton, a atividade da enzima pode ser reduzida. Além disso, os substratos podem também serem afetados. Se um substrato contém um grupo ionizável, as mudanças no pH afetam a capacidade de ligação ao sítio ativo. Segundo, alterações nos grupos ionizáveis podem modificar a estrutura terciária das enzimas. Mudanças drásticas no pH promovem a desnaturação de muitas enzimas.

Apesar de algumas enzimas tolerar grandes mudanças no pH, a maioria delas são ativas somente em intervalos muitos estreitos. Por essa razão, os organismos vivos empregam tampões que regulam o pH. O valor do pH no qual a atividade da enzima é máxima é chamado *pH ótimo.* O pH ótimo das enzimas varia consideravelmente. Por exemplo, o pH ótimo da pepsina, enzima proteolítica produzida no estômago é, aproximadamente, 2. Para a quimotripsina, que digere as proteínas no intestino delgado, o pH ótimo é, aproximadamente, 8. O efeito do pH sobre a atividade das enzimas é esquematizado na Figura 3.6.

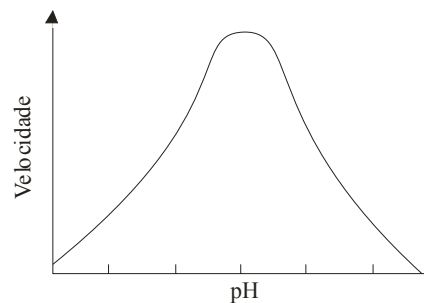



Figura 3.6
Atividade enzimática versus pH (considerando-se os outros fatores constantes)

C. Concentração da enzima

A velocidade máxima da reação é uma função da quantidade de enzima disponível, aquela aumenta proporcionalmente pela introdução de mais enzima ao sistema. Assim, a velocidade inicial da reação enzimática é diretamente proporcional à concentração de enzima (existindo substrato em excesso) (Figura 3.7).

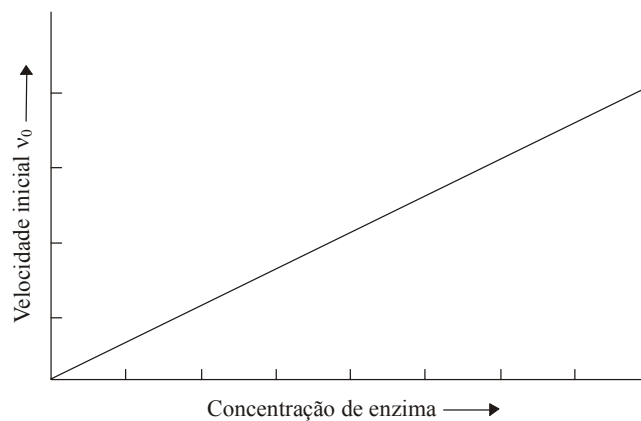



Figura 3.7
Efeito da concentração da enzima sobre a velocidade inicial (v_0). A concentração do substrato está acima da necessária para atingir a velocidade máxima.

D. Concentração do substrato

Para atender as necessidades do organismo, as reações bioquímicas devem ocorrer em velocidade compatível. A *velocidade* de uma reação bioquímica é expressa em termos de formação de produto ou pelo consumo do reagente por unidade de tempo. Ao considerar uma *reação unimolecular* (que envolve um único reagente):

$$A \rightarrow P$$

O progresso da reação é descrita pela *equação da velocidade* na qual a velocidade é expressa em termos da constante de velocidade (k) e a concentração do reagente [A]:

$$\text{Velocidade} = \upsilon = \frac{-\Delta[\text{A}]}{\Delta t} = k[\text{A}]$$

onde [A] = concentração do substrato, t = tempo e k = constante de proporcionalidade designada *constante de velocidade* (sua unidade é o recíproco do tempo, s^{-1}) que depende das condições da reação (temperatura, pH e força iônica). O sinal negativo para as variações da [A] indica que A está sendo consumido na reação. A equação mostra que a velocidade da reação é diretamente proporcional a concentração do reagente A. O processo exibe c*inética de primeira ordem* (Figura 3.8).

Quando a adição de mais reagente não aumenta a velocidade, a reação exibe cinética *de ordem zero* (Figura 3.8). A expressão da velocidade para a reação A → P é

$$\text{Velocidade} = k[\text{A}]^0 = k$$

A velocidade é constante porque não depende da concentração dos reagentes, mas de outros fatores. A quantidade de reagente é o suficiente grande para saturar todos os sítios catalíticos das moléculas enzimáticas. Assim, o reagente só existe na forma de complexos enzima–substrato (ES). Como a curva velocidade-substrato é hiperbólica, a fase de ordem zero atinge uma velocidade máxima, V_{max}.

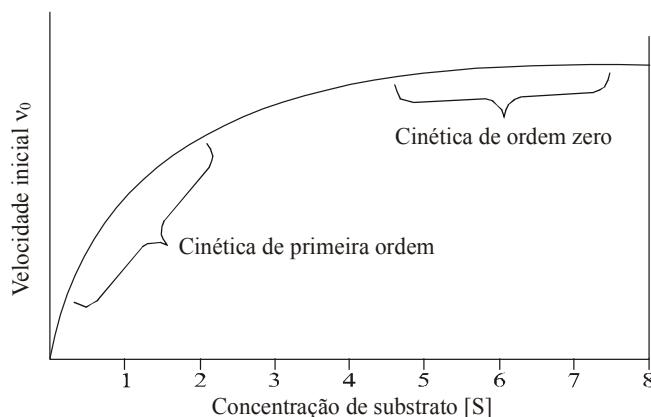



Figura 3.8

Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial (v_0) em reações catalisadas por enzimas.

Uma reação *bimolecular* ou de *segunda ordem* pode ser escrita:

$$\text{A} + \text{B} \rightarrow \text{C}$$

Sua equação de velocidade é

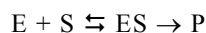
$$\text{Velocidade} = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[B]}{\Delta t} = k[A][B]$$

O k é a constante de velocidade de segunda ordem e tem como unidade $M^{-1} \cdot s^{-1}$. A velocidade de uma reação de segunda ordem é proporcional ao produto da concentração dos dois reagentes ([A][B]).

3.7 Cinética enzimática

O estudo da velocidade das reações enzimáticas ou cinética enzimática, envolve informações indiretas sobre o mecanismo de ação catalítica, especificidade das enzimas, alguns fatores que afetam a velocidade das reações e a determinação quantitativa de seus efeitos. Apesar de catalisarem uma grande variedade de reações por diferentes mecanismos, as enzimas podem ser analisadas quanto as suas velocidades para quantificar as suas eficiências.

Quando o substrato S liga o sítio ativo de uma enzima E, um *complexo enzima–substrato* (ES) é formado em processo rápido e reversível antes da formação do produto. Após um breve tempo, o produto se dissocia da enzima conforme a equação:

$$E + S \leftrightarrows ES \rightarrow P$$

onde
k_1 = constante de velocidade para a formação do complexo ES
k_2 = constante de velocidade para a dissociação de ES em P
k_3 = constante de velocidade para a formação de produto e liberação do sítio ativo.

A relação quantitativa entre a velocidade de reação enzimática e a concentração do substrato é definida pela equação de *Michaelis–Menten* (Leonor Michaelis e Maud Menten em 1913). No desenvolvimento da equação deve-se supor que (1) o k_2 é negligenciável quando comparado com k_1 e (2) a velocidade de formação de ES é igual a velocidade de sua degradação não sofrendo alterações durante a medida da velocidade (*postulado do estado estacionário*):

$$\text{Velocidade} = \frac{\Delta P}{\Delta t} = k_3[ES]$$

Para ter utilidade, a velocidade de uma reação deve ser definida em termos de [S] e [E]. A velocidade de formação de ES é igual a k_1[E][S], enquanto a velocidade de dissociação de ES é igual a (k_2 + k_3)[ES]. O postulado do estado estacionário iguala as duas velocidades:

$$K_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$$

$$[ES] = \frac{[E]\,[S]}{(k_2 + k_3)/k_1}$$

Michaelis e Menten introduziram uma nova constante, K_m

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

assim, a expressão de velocidade pode ser obtida após manipulação algébrica adequada:

$$\nu_o = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Essa é a *equação de Michalis–Menten* que relaciona a *velocidade inicial* (ν_o, mudança na concentração de reagente ou produto durante os primeiros poucos segundos da reação) de uma reação catalisada por enzima com a concentração do substrato. As duas constantes nessa equação, a *velocidade máxima* ($V_{max,}$ velocidade atingida sob condições de saturação da enzima em condições específicas de temperatura, pH e força iônica) e K_m são específicas para cada enzima sob condições específicadas de pH e temperatura. Para aquelas, onde $k_3 << k_2$, a K_m torna-se a recíproca da constante de ligação enzima-substrato:

$$K_m = \frac{1}{K_a}$$

e a V_{max} reflete a fase catalítica do mecanismo enzimático conforme sugere a equação 3.1. Em outras palavras, nesse modelo simples da atividade da enzima distingue-se duas fases: inicialmente a ligação do substrato seguida pela modificação química do mesmo.

Se for permitido à velocidade inicial de reação, ν_0, ser igual a metade da velocidade máxima (v_0 = ½ V_{max}) na equação 3.3, o K_m será igual a [S]:

$$\frac{1}{2} V_{max} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Dividindo por V_{max}, obtém-se

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Reorganizando a equação:

$$K_m + [S] = 2[S]$$

$$K_m = [S]$$

O valor do K_m (constante de Michaelis) *é numericamente igual à concentração do substrato (mol/L) na qual a velocidade inicial da reação corresponde à metade da velocidade máxima*. Ou seja, na concentração de substrato em que [S] = K_m, a equação de Michaelis–Menten torna-se $\nu_0 = V_{max}/2$. A concentração da enzima não afeta o K_m.

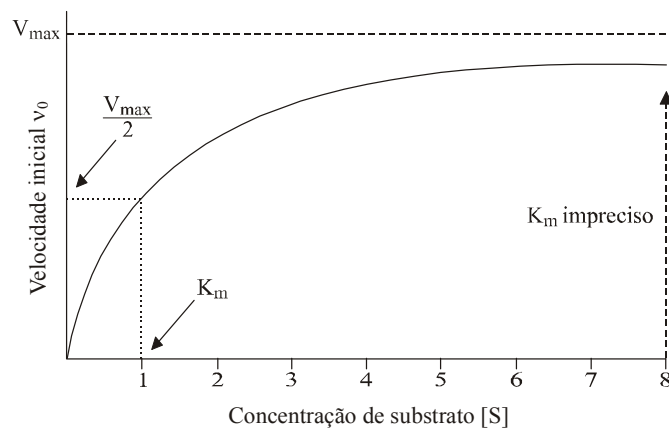



Figura 3.9
Determinação do K_m pelo gráfico de velocidade inicial (v_0) versus concentração do substrato, [S]. O K_m é a concentração do substrato (mol por litro) na qual a velocidade inicial da reação é metade da velocidade máxima.

Valores pequenos de K_m refletem *afinidade elevada* da enzima pelo substrato e, portanto, atingirá a máxima eficiência catalítica em baixas concentrações de substrato. Valores grandes de K_m refletem *baixa afinidade* da enzima pelo substrato.

Tabela 3.2 – Valores do K_m para algumas enzimas

Enzima	Substrato	K_m (μM)
Anidrase–carbônica	CO_2	8.000
Arginina–tRNA–sintetase	Arginina	3
	tRNA	0,4
	ATP	300
β–Galactotidase	Lactose	4.000
Lisozima	Hexa–*N*–acetilglicosamina	6
Penicilase	Benzilpenicilina	50
Piruvato–carboxilase	Piruvato	400
	HCO_3^-	1.000
	ATP	60
Quimiotripsina	Acetil–1–triptofanamida	5.000
Treonina–desaminase	Treonina	5.000

A. Constante catalítica (k_{cat})

As enzimas nas células e fluídos do corpo normalmente não atuam em concentrações saturadas de substrato. Para avaliar a eficiência catalítica de uma enzima, define-se a *constante catalítica,* k_{cat} também conhecida como *número de reciclagem* (turnover number):

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_{total}}$$

k_{cat} representa o número de moléculas de substrato convertidos em produto por segundo por molécula de enzima (ou por mol de sítio ativo nas enzimas oligoméricas) sob condições de saturação. Em outras palavras, o K_{cat} indica o número máximo de moléculas convertidas em produto por segundo por cada sítio ativo. $[E]_{total}$ = concentração total da enzima.

Tabela 3.3 – Constantes catalíticas de algumas enzimas

Enzima	K_{cat} (s^{-1})
Nuclease estafilicócica	95
Citidina–deaminase	299
Triose–fosfato–isomerase	4.300
Ciclofilina	13.000
Cetoesteróide–isomerase	66.000
Anidrase–carbônica	1.000.000

B. Constante de especificidade (k_{cat}/K_m)

A relação k_{cat}/K_m é chamada *constante de especificidade* e relaciona a eficiência catalítica da enzima com a sua afinidade pelo substrato. A velocidade da reação varia diretamente com a freqüência de colisões entre as moléculas de enzima e as de substrato na solução. A decomposição do complexo ES em E + P não pode ocorrer mais velozmente que o encontro de E e S para formar ES.

A relação k_{cat}/K_m é, em geral, o melhor parâmetro cinético para comparações de eficiência catalítica entre diferentes enzimas. Valores baixos da relação indicam pouca afinidade da enzima pelo substrato. Por exemplo, a *acetilcolinoestarase* tem valor de k_{cat}/K_m de 1,5 x 10^8 $s^{-1}M^{-1}$ mostrando alta eficiência, enquanto a *urease* o valor é 4 x 10^5 $s^{-1}M^{-1}$ descreve uma menor eficiência.

Tabela 3.4 – Constante de especificidade, k_{cat}/K_m, de algumas enzimas

Enzima	k_{cat}/K_M ($s^{-1}M^{-1}$)
Acetilcolinesterase	1.6×10^8
Anidrase–carbônica	8.3×10^7
Catalase	4×10^7
Crotonase	2.8×10^8
Fumarase	1.6×10^8
Triose–phosphate–isomerase	2.4×10^8
β–Lactamase	1×10^8
Superoxide–dismutase	7×10^9

C. Gráfico de Lineweaver-Burk

Os valores do K_m e da V_{max} de uma enzima são determinados pela medida das velocidades iniciais para várias concentrações de substrato. Pela construção do gráfico mostrado na Figura 3.6 só é possível calcular valores aproximados de K_m e da V_{max}. A determinação mais acurada desses valores é possível pela modificação algébrica da equação de Michaelis–Menten:

$$\nu_o = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

utilizando o inverso da equação:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

A representação gráfica da recíproca de velocidade inicial, $1/\nu_0$, *versus* a recíproca da concentração do substrato, $1/[S]$, fornece uma linha reta com inclinação K_m/V_{max} em um gráfico *duplo-recíproco* ou *Lineweaver–Burk*. O ponto onde essa linha intercepta a ordenada é igual a $1/V_{max}$, e o ponto de intersecção na abscissa é igual a-$1/K_m$ (Figura 3.10). A utilização do gráfico permite calcular com precisão V_{max} e K_m pela medida da inclinação e do intercepto.

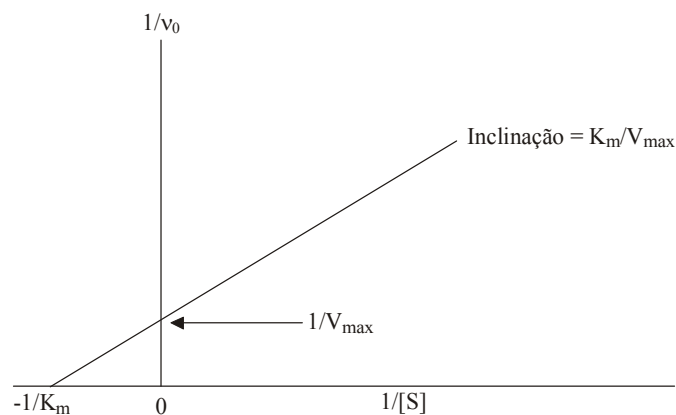



Figura 3.10
Determinação da V_{max} e K_m a partir do gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk. O gráfico $1/\nu_0$ versus $1/[S]$ derivado de medidas das velocidades iniciais em várias concentrações diferentes de substratos. A linha reta obtida pela ligação de pontos individuais é ampliada para interceptar a ordenada e abscissa. Os valores de K_m e V_{max} são determinados pela medida das inclinações e intersecções.

D. Reações com multissubstratos

Mais da metade das reações bioquímicas envolvem dois substratos, em lugar de reações simples com um único substrato e que

obedecem o modelo de Michaelis–Menten. As reações com multissubstratos podem proceder por diferentes mecanismos:

1. *Mecanismo ordenado.* Os substratos, S_1 e S_2, devem associar-se à enzima com uma ordem obrigatória antes que a reação possa ocorrer. A ligação do primeiro substrato é necessária para que a enzima forme o sítio de ligação para o segundo substrato. Muitas desidrogenases nas quais o segundo substrato é uma coenzima (NAD^+, FAD etc.) são exemplos desse mecanismo.

2. *Mecanismo aleatório.* Os dois substratos, S_1 e S_2, podem se ligar à enzima em qualquer ordem. A hexocinase transfere um grupo fosfato do ATP para a glicose por esse mecanismo, apesar da glicose tender ligar inicialmente a molécula de ATP.

3. *Reações de dupla–troca (pingue–pongue).* Um ou mais produtos são liberados antes que os outros substratos se liguem à enzima modificada. As reações catalisadas pela UDP–glicose–1–fosfato uridiltransferase, piruvato–carboxilase e acetil–CoA–carboxilase são exemplos desse mecanismo.

3.8 Inibição enzimática

Inibidores são substâncias que reduzem a atividade das enzimas e incluem fármacos, antibióticos, preservativos de alimentos e venenos. São importantes por várias razões: (1) Os inibidores enzimáticos atuam como reguladores das vias metabólicas. (2) Muitas terapias por fármacos são baseadas na inibição enzimática. Por exemplo, muitos antibióticos e fármacos reduzem ou eliminam a atividades de certas enzimas. O tratamento da AIDS inclui inibidores das proteases, moléculas que inativam a enzima necessária para produzir novos vírus. (3) Desenvolvimento de técnicas para demonstrar a estrutura física e química, e as propriedades funcionais das enzimas.

Distinguem-se dois tipos de inibição: *reversível* e *irreversível,* segundo a estabilidade da ligação entre o inibidor e a molécula de enzima. Na inibição reversível ocorre interações não-covalentes entre o inibidor e a enzima, enquanto na inibição irreversível envolve modificações químicas da molécula enzimática, levando a uma inativação definitiva. Na inibição reversível, a enzima retoma sua atividade após dissociação do inibidor. Três classes de inibidores reversíveis são descritos: *competitivo, não–competitivo* e *incompetitivo*.

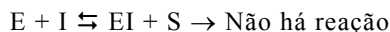
Quadro 3.4 Inibidores de enzimas do HIV

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) leva à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) infectando as células do sistema imune. Nas primeiras etapas da infecção, o HIV fixa-se à célula-alvo e injeta o seu material genético (RNA em vez de DNA) na célula hospedeira. O RNA viral é transcrito em DNA por uma enzima viral conhecida como *transcriptase reversa.* A seguir, o DNA é integrado no genoma do hospedeiro, e a célula pode produzir mais RNA viral e proteínas para empacotá-los em novas partículas virais.

Vários inibidores da transcriptase reversa foram desenvolvidos. O arquétipo é o AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina; Zidovudina), o qual é absorvido pelas células, fosforilado e incorporado nas cadeias de DNA sintetizadas pela transcriptidase reversa a partir do molde do HIV. Uma vez que o AZT não possui o grupo 3'-OH, ele funciona como um terminador de cadeia, da mesma maneira que os didesoxinucleotídeos utilizados no sequenciamento do DNA. A maioria das DNA-polimerases celulares tem baixa afinidade pela AZT fosforilado, mas a transcriptidase reversa tem uma alta afinidade por essa droga, o que torna o AZT efetivo contra a replicação.

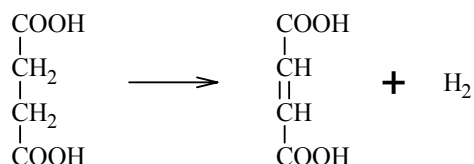
A. Inibição competitiva

Inibidores competitivos são substâncias que competem diretamente com o substrato normal pelo sítio ativo das enzimas. São moléculas estruturalmente semelhantes ao substrato. O inibidor (I) competitivo reage reversivelmente com a enzima para formar um complexo enzima–inibidor (EI) análogo ao complexo enzima–substrato, mas cataliticamente inativo:

$$E + I \leftrightarrows EI + S \rightarrow \text{Não há reação}$$

A atividade da enzima declina por não ocorrer a formação do complexo enzima–substrato durante a existência do complexo EI. A ação do inibidor pode ser revertida aumentando-se a quantidade de substrato. Em altas [S], todos os sítios ativos estão preenchidos com substrato e a velocidade da reação atinge o mesmo valor que o observado sem o inibidor.

Como o substrato e o inibidor competem pelo mesmo sítio de ligação na enzima, o K_m para o substrato mostra um *aumento* aparente em presença do inibidor. Ou seja, mais substrato é necessário para atingir a metade da V_{max}. Não há alteração na V_{max} quando a concentração do substrato é suficientemente elevada.

Um exemplo clássico de inibição competitiva envolve a enzima *succinato–desidrogenase* uma enzima do ciclo do ácido cítrico que converte o *succinato* a *fumarato* pela remoção de dois átomos de hidrogênio:

$$\begin{matrix} COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{matrix} \longrightarrow \begin{matrix} COOH \\ | \\ CH \\ || \\ CH \\ | \\ COOH \end{matrix} + H_2$$

O *malonato* é análogo em sua estrutura ao succinato e liga-se ao sítio ativo da enzima mas não é convertido a produto.

COOH
|
CH_2 ⟶/⟶ Produto
|
COOH

O mecanismo da inibição competitiva é mostrado na Figura 3.11.

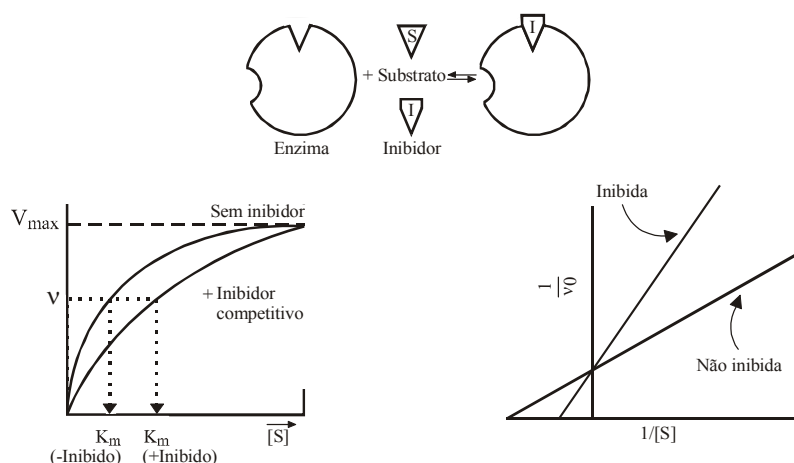



Figura 3.11
Inibição competitiva. Gráficos de v_o *versus* concentração de substrato para uma reação de Michaelis–Menten na presença de um inibidor competitivo. A segunda figura mostra o mesmo tipo de inibição em um gráfico de Lineweaver–Burk.

B. Inibição não-competitiva

O inibidor não-competitivo se liga tanto à enzima como ao complexo ES em um sítio diferente do sítio de ligação do substrato. A ligação do inibidor não bloqueia a ligação do substrato, mas provoca uma modificação da conformação da enzima que evita a formação de produto:

$$E + I \leftrightarrows EI + S \leftrightarrows EIS \rightarrow \text{Não há reação}$$

$$E + S \leftrightarrows ES + I \leftrightarrows EIS \rightarrow \text{Não há reação}$$

A inibição não reverte pelo aumento na concentração do substrato. O inibidor reduz a concentração da enzima ativa e, assim, diminui a V_{max} aparente. Nesses casos, o inibidor não afeta o K_m para o substrato. O inibidor não-competitivo não apresenta semelhança estrutural com o substrato. Os metais pesados, Hg^{2+} e Pb^{2+}, que ligam-se aos grupos sulfidrílicos e modulam a conformação da enzima, são exemplos de inibidores não-competitivos

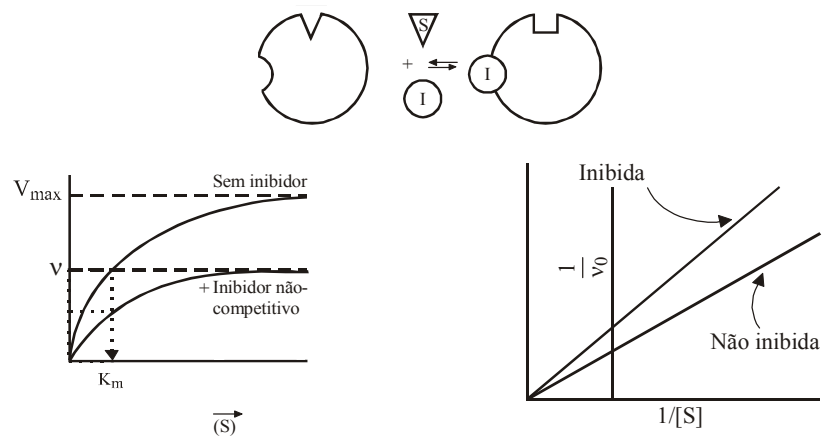



Figura 3.12
Inibição não-competitiva. A. Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial na presença de um inibidor não-competitivo. B. Gráfico de Lineweaver-Burk para a reação mostrada em A.

C. Inibição incompetitiva

O inibidor incompetitivo liga-se apenas ao complexo ES da enzima originando um complexo inativo, ESI. O inibidor não se combina com a enzima livre.

$$E + S \leftrightarrows ES + I \leftrightarrows EIS \rightarrow \text{Não há reação}$$

A inibição não é revertida pelo aumento na concentração do substrato. O resultado é a modificação aparente do K_m e V_{max}. (Figura 3.14).

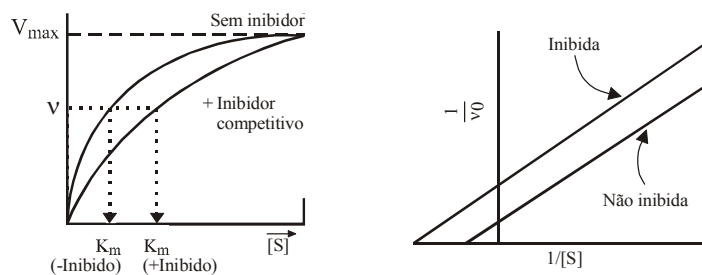



Figura 3.13
Gráfico de Lineweaver-Burk para um inibidor incompetitivo.

D. Inibição irreversível

A inibição irreversível envolve modificação covalente e permanente do grupo funcional necessário para a catálise, tornando a enzima inativa. È classificado como um *inativador*. Alguns pesticidas inibem o sítio ativo da acetilcolina–esterase, o que impede a hidrólise

da acetilcolina na sinapse, resultando, no homem, paralisia dos músculos respiratórios e edema pulmonar.

E. Fármacos que atuam como inibidores enzimáticos

Muitos fármacos modernos atuam como inibidores da atividade enzimática. Esse mecanismo é encontrado com antivirais, antitumorais e antibacterianos. Os compostos com diferentes estruturas em relação ao substrato natural que atuam como inibidores são conhecidos como *antimetabólitos*. Entre os quais citam-se, as *sulfas* (a sulfanilamida compete com o ácido *p*–aminobenzóico necessário para o crescimento bacteriano), o *metotrexato* (compete com o diidrofolato e é usado no tratamento da leucemia infantil), *substratos suicidas* (geram uma espécie altamente reativa que reage de forma irreversível com o sítio ativo, exemplo, o Omeprazol usado no tratamento de excessiva acidez estomacal), *fluorouracil* (inibidor irreversível da timidilato–sintetase) e *6–mercaptopurina* (compete com a adenina e guanina e é efetiva no tratamento de leucemias infantis).

3.9 Regulação da atividade enzimática

Além da influência exercida sobre a atividade enzimática de diversos fatores, tais como: concentração do substrato e enzima, pH, temperatura e presença de co–fatores, tem-se também, a integração das enzimas nas vias metabólicas e a interrelação dos produtos de uma via com a atividade de outras vias. As vias metabólicas não operam em capacidade máxima o tempo todo. De fato, muitos processos podem ser interrompidos, inibidos ou ativados, durante certas fases no ciclo de vida da célula. Se assim não fosse, a célula teria um crescimento descontrolado e antieconômico.

A regulação das vias metabólicas ocorre por meio da modulação da atividade de uma ou mais enzimas-chave do processo. A etapa de maior energia de ativação é denominada *etapa de comprometimento* (geralmente uma reação irreversível). Comumente, enzima-chave que catalisa a etapa comprometida serve como válvula de controle do fluxo de moléculas no percurso metabólico.

Quadro 3.5 Inibidores irreversíveis

Inibidores enzimáticos irreversíveis são geralmente substâncias tóxicas. Podem ser substâncias naturais ou sintéticas.

Os compostos *organofosforados* como o diisopropilfosfofluoridato (DIFP), formam ligações covalentes com o grupo OH de resíduos de serina 195 da acetilcolinesterase (enzima que catalisa a hidrólise da acetilcolina), inativando-a. A *iodoacetamida*, reage com o grupo SH de resíduos de cisteína. Esses inibidores são bastante tóxicos para os organismos, não só pela irreversibilidade de sua ligação às enzimas, mas também devido à sua inespecificidade.

Outro exemplo de inibidor irreversível é a *aspirina* (*ácido acetil-salicílico*), porém com propriedades farmacológicas (antiinflamatório, antipirético e analgésico). A aspirina transfere irreversivelmente seu grupo acetil para o grupo OH de um resíduo de serina da molécula de cicloxigenase, inativando-a. Essa enzima é responsável pela catálise da primeira reação da síntese de *prostaglandinas* (substâncias reguladoras de muitos processos fisiológicos).

A *penicilina* liga-se especificamente às enzimas da via de síntese da parede bacteriana, inibindo-as irreversivelmente.

A regulação das vias bioquímicas envolve mecanismos sofisticados e complexos. É conseguida principalmente pelo ajuste das concentrações e atividades de certas enzimas. O controle é atingido por: (1) controle genético, (2) modificação covalente, (3) regulação alostérica e (4) compartimentalização.

A. Controle genético

A quantidade das enzimas disponíveis nas células depende da velocidade de sua síntese e da velocidade de sua degradação. A síntese de enzimas em resposta às mudanças das necessidades metabólicas é um processo conhecido como *indução enzimática*, que permite a resposta celular de maneira ordenada às alterações no meio.

A síntese de certas enzimas pode ser especificamente inibida por *repressão*. O produto final de uma via bioquímica pode inibir a síntese de uma enzima-chave da mesma via.

B. Regulação por modificação covalente

A atividade de algumas enzimas que modulam o fluxo das vias metabólicas, é regulada por modificações covalentes reversíveis, em reações catalisadas por outras enzimas. Isso resulta na ativação ou inibição da atividade enzimática. Freqüentemente, a modificação envolve a *fosforilação* e *defosforilação* da enzima por adição ou remoção de grupos fosfato ou, por modificações covalentes de outro tipo. As fosforilação e defosforilação são catalisadas por *proteínas–cinases* e *proteínas–fosfatases*, respectivamente. Como exemplo do processo regulador, tem-se a enzima glicogênio fosforilase que catalisa o desdobramento do glicogênio. A enzima se apresenta na forma fosforilada (ativa) e desfosforilada (inativa) em processo de interconversão cíclica entre as duas formas. O mecanismo geral de regulação por modificação covalente está intimamente associado à ação hormonal.

Outros exemplos de modificações covalentes reversíveis incluem acetilação–desacetilação, adenilação–desadenilação, uridinilação–desuridililação e metilação–desmetilação.

C. Regulação alostérica

As enzimas reguladas por moduladores ligados a sítio(s) adicional(is) e que sofrem mudanças conformacionais não-covalentes são denominadas *alostéricas*. A afinidade da ligação enzima-substrato das enzimas alostéricas é modificada por ligantes denominados *efetores* ou *moduladores alostéricos*, unidos reversível e não–covalentemente a locais específicos da estrutura tridimensional protéica e nominados *sítios alostéricos,* que são diferentes e distantes dos sítios ativos específicos para os substratos. Os efetores são pequenas moléculas orgânicas, por exemplo, o ATP (trifosfato de adenosina), proteínas de baixo peso molecular, substratos ou produtos da reação. A maioria das enzimas sujeitas a esses efeitos são decisivas na regulação do metabolismo intermediário.

Os efetores podem ser:

- *Efetor alostérico positivo* – aumenta a afinidade da enzima pelo substrato e, assim, eleva a velocidade da reação.
- *Efetor alostérico negativo* – reduz a afinidade da enzima pelo substrato e, assim, diminui a velocidade da reação.

A maioria das enzimas alostéricas é *oligomérica*; ou seja, são compostas de várias subunidades polipeptídicas, cada uma com um sítio ativo. Em algumas enzimas, o sítio alostérico e o sítio ativo estão localizados na mesma subunidade (ex.: piruvato–carboxilase); em outras, estão localizados em subunidades diferentes (ex.: aspartato–carbamoiltransferase). Em conseqüência da natureza oligomérica das enzimas alostéricas, a ligação do substrato a uma subunidade pode afetar a ligação de outras moléculas de substrato aos outros sítios ativos. *Cooperatividade* é a influência que a união de um ligante a uma protômero tem sobre a união de ligante a outro protômero numa proteína oligomérica. A interação estabelecida entre os sítios ativos é evidenciada pela cinética da catálise: o gráfico de v_o *versus* a concentração de substrato [S] é uma *curva sigmóide,* em lugar da *curva hiperbólica* de Michaelis–Menten (Figura 3.14).

Quanto a cooperatividade as reações podem ser:

- *Positivamente cooperativa* onde a ligação do primeiro substrato aumenta a afinidade de substratos adicionais por outros sítios ativos.
- *Negativamente cooperativa* em que a ligação do primeiro substrato reduz a afinidade por substratos adicionais.

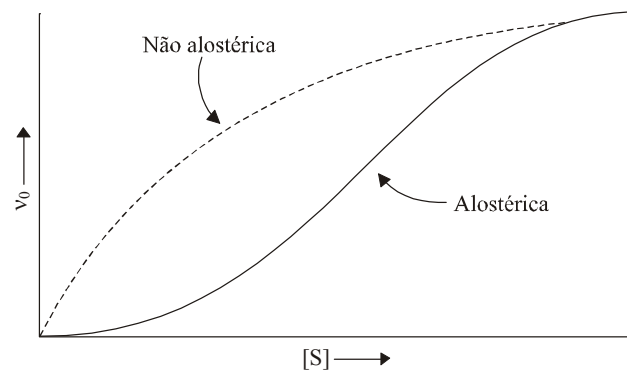



Figura 3.14
Velocidade inicial da reação versus a concentração de substrato (S) para enzimas alostéricas comparadas com enzimas não–alostéricas.

As enzimas alostéricas podem exercer diferentes efeitos:

- *Interações homotrópicas*. A união do ligante a um protômero pode afetar a união de ligantes aos outros protômeros do oligômero.
- *Interações heterotrópicas*. É o efeito de um ligante sobre a ligação de um ligante diferente; o efeito pode ser tanto positivo como negativo.

Algumas enzimas alostéricas têm dois ou mais efetores e podem ser reguladas por efetores positivos e negativos que poderão estar presentes em diferentes concentrações.

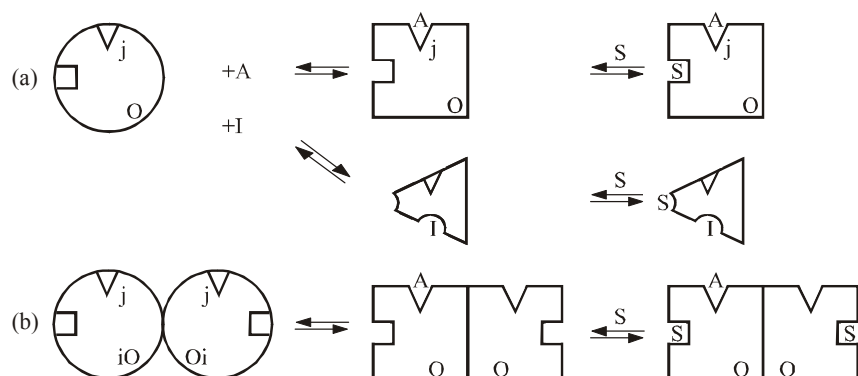



Figura 3.15
Modelos de sistemas de enzimas alostéricas. (a) *Modelo de uma enzima monomérica.* A ligação de um efetor alostérico positivo (A) ao sítio ativador, j, induz a uma nova conformação da enzima, com maior afinidade pelo substrato. A ligação de um efetor alostérico negativo ao sítio inibidor, i, resulta numa conformação da enzima com afinidade diminuída pelo substrato (S). (b) *Modelo de uma enzima alostérica polimérica.* A ligação de um efetor alostérico positivo (A) no sítio j, causa uma mudança alostérica na conformação do protômero ao qual o efetor se liga que é transmitida a um segundo protômero por meio de interações cooperativas protômero–protômero. A afinidade pelo substrato

aumenta nos dois protômeros. Um efetor negativo diminui a afinidade pelo substrato nos dois protômeros.

Dois modelos explicam o comportamento de enzimas alostéricas com curvas sigmoidais v_0 *versus* [S] que refletem as interações cooperativas entre as subunidades oligoméricas:

1. Modelo concertado (ou de simetria). Proposto por Monod, Wyman e Changeux, onde as subunidades estão todas na forma inativa (T, tenso) ou todas na forma ativa (R, relaxado). Os estados T e R estão em equilíbrio. Ativadores e substratos favorecem o estado R. Inibidores favorecem o estado T. Uma mudança conformacional num protômero causa uma mudança correspondente em todos os protômeros.

2. Modelo seqüencial. Proposto por Koshland, Némethy e Filmer as subunidades podem sofrer a mudança conformacional individualmente. A ligação do substrato aumenta a probabilidade da mudança conformacional. A mudança em uma subunidade faz ocorrer uma mudança similar na subunidade adjacente, vizinho do protômero contendo o ligante unido, assim como torna mais provável a ligação de uma segunda molécula de substrato.

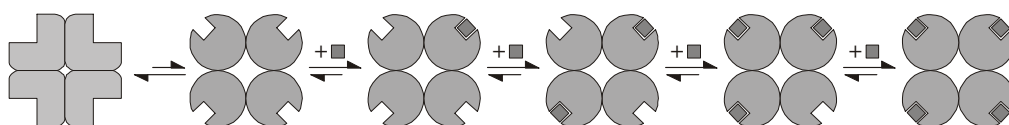
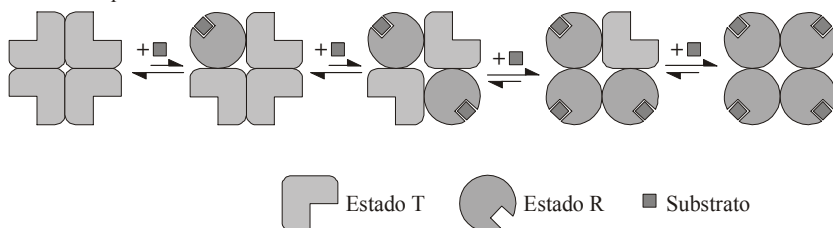



Figura 3.16
Comportamento das enzimas alostéricas. No modelo concertado, todas as unidades são convertidas do estado T (baixa afinidade) para o estado R (alta afinidade) simultaneamente. No modelo seqüencial, as subunidades sofrem mudanças conformacionais progressivamente com as ligações do substrato.

D. Zimogênios

Muitas enzimas são sintetizadas como precursores inativos e, subsequentemente, ativadas pela clivagem de uma ou mais ligações peptídicas específicas. O precursor inativo é chamado *zimogênio* (ou *proenzima*). Não é necessária uma fonte de energia (ATP) para a clivagem.

As formas zimogênios são geralmente designadas pelo sufixo −*ogênio* depois do nome da enzima; a forma zimogênio da quimotripsina é denominada quimotripsino*gênio*. Algumas vezes, a forma zimogênio é referida pró-enzima; a forma zimogênio do colágeno é o pro−colágeno.

A proteólise específica é um meio comum de ativação de enzimas e outras proteínas nos sistemas biológicos. Exemplos:

- As enzimas digestivas que hidrolisam proteínas são sintetizadas como zimogênios no estômago e pâncreas (Quadro 3.3).
- A coagulação sangüínea é mediada por uma cascata de ativadores proteolíticos que asseguram uma rápida e amplificada resposta a lesão celular. Os zimogênios são sintetizados nas células do fígado e são secretados no sangue para subseqüente ativação por serino-proteases.
- Alguns hormônios protéicos são sintetizados como precursores inativos. Por exemplo: a *insulina* é derivada da *pró−insulina* pela remoção proteolítica de um peptídeo.
- A proteína fibrosa *colágeno,* o maior constituinte da pele e ossos, é derivado do *pro−colágeno*, um precursor solúvel.
- Muitos processos de desenvolvimento são controlados pela ativação de zimogênios. Por exemplo, parte do colágeno é desdobrado no útero dos mamíferos após o parto. A conversão da *pró−colagenases* em *colagenases,* a protease ativa, é realizado no momento apropriado dentro do processo.
- A *apoptose* ou a *morte celular programada* é mediada por enzimas proteolíticas denominadas *captases* e sintetizadas na forma de precursor *pró−caspases.* Quando ativadas por vários sinais, as caspases atuam na morte celular. A apoptose promove um meio de esculpir as formas de parte do corpo no curso do desenvolvimento e um meio de eliminar células produtoras de auto-anticorpos ou infectadas com patógenos também como, células contendo uma grande quantidade de DNA lesado.

Quadro 3.3 – Zimogênios gástricos e pancreáticos

Local de síntese	**Zimogênio**	**Enzima ativa**
Estômago	Pepsinogênio	Pepsina
Pâncreas	Quimiotripsinogênio	Quiniotripsina
Pâncreas	Tripsinogênio	Tripsina
Pâncreas	Pró−carboxipeptidase	Carboxipeptidase
Pâncreas	Proelastase	Elastase

E. Isoenzimas

Outro fenômeno de regulação metabólica e que depende da estrutura quaternária das proteínas enzimáticas são as isoenzimas. As *isoenzimas* ou isozimas são formas moleculares múltiplas de uma

enzima, que realizam a mesma ação catalítica e ocorrem na mesma espécie animal. O exemplo clássico é a *lactato–desidrogenase* (LDH) um tetrâmero formado por duas espécies diferentes de cadeias polipeptídicas, denominadas M (músculo) e H (coração). Essas subunidades são codificadas por genes diferentes. A combinação das duas cadeias produz cinco isoenzimas que podem ser separadas eletroforeticamente (Quadro 3.4).

Quadro 3.4 – Composição das subunidades da lactato-desidrogenase e suas principais localizações

Tipo	Composição	Localização
LDH–1	HHHH	Miocárdio e eritrócitos
LDH–2	HHHM	Miocárdio e eritrócitos
LDH–3	HHMM	Cérebro e fígado
LDH–4	HMMM	-
LDH–5	MMMM	Músculo esquelético e fígado

A lactato desidrogenase catalisa a redução reversível do piruvato a lactato. Desse modo, no músculo esquelético a isoenzima LDH–5 apresenta V_{max} elevada para o piruvato e, portanto, converte rapidamente o piruvato a lactato. No caso da LDH–1, encontrada no coração a V_{max} é relativamente baixa para o piruvato, não favorecendo a formação do lactato. O excesso de piruvato inibe a isoenzima LDH–1. O músculo cardíaco, um tecido essencialmente aeróbico, metaboliza a glicose a piruvato e, a seguir, a CO_2 e H_2O, produzindo pouco lactato. Entretanto, em situações de déficit de oxigênio, o piruvato pode ser convertido a lactato como medida de emergência. Assim, as características cinéticas distintas das duas enzimas determinam o tipo de metabolismo em cada tecido.

Foram estudadas isoenzimas de várias enzimas diferentes, sendo as mais importantes, do ponto de vista clínico, além da lactato desidrogenase, a creatina cinase e a fosfatase alcalina.

3.10 Aplicações clínicas das enzimas

Muitas das enzimas presentes no plasma, líquido cefalorraquidiano, urina e exudatos, são provenientes, principalmente, do processo normal de destruição e reposição celular. Entretanto, certas enzimas se apresentam, nesses líquidos, em teores elevados após lesão tecidual provocadas por processos patológicos com o aumento na permeabilidade celular ou morte prematura da célula. Nos casos de alteração da permeabilidade, as enzimas de menor massa molecular aparecem no plasma. Quanto maior o gradiente de concentração entre os níveis intra e extracelular, mais rapidamente a enzima difunde para fora. As enzimas citoplasmáticas surgem no plasma antes daquelas presentes nas organelas sub–celulares. Quanto maior a extensão do tecido lesado, maior o aumento no nível plasmático. As enzimas não específicas do plasma

são clarificadas em várias velocidades, que dependem da estabilidade da enzima e sua susceptibilidade ao sistema reticuloendotelial.

Algumas enzimas tem sua atividade no próprio plasma; por exemplo, as enzimas associadas a coagulação sangüínea (trombina), dissolução de fibrina (plasmina) e clareamento de quilomicrons (lipase lipoprotéica). As enzimas mais ensaiadas no laboratório clínico são mostradas na Quadro 3.5.

Quadro 3.5 – Enzimas rotineiramente ensaiadas no laboratório clínico

Enzimas	Órgão ou tecido afetado
Aldolase	Músculo, coração
Amilase	Pâncreas
Creatina–cinase (CK ou CPK)	Coração, músculo, cérebro
Fosfatase ácida	Próstata (carcinoma)
Fosfatase alcalina	Fígados, ossos
Lactato–desidrogenase (DHL)	Fígado, coração, eritrócitos
Lipase	Pâncreas
γ-Glutamil–transpeptidase	Fígado
Glicose 6–P–desidrogenase	Eritrócitos (doença genética)
Transaminase–oxalacética (OT)	Fígado, coração
Transaminase–pirúvica (PT)	Fígado, coração

Resumo

1. As enzimas são catalisadores biológicos. Elas aumentam a velocidade da reação pois seguem uma via alternativa que necessita menos energia que a reação não-catalisada. As enzimas são específicas para o ripo de reação que catalisam. Cada tipo de enzima possui um local específico em sua superfície denominado sítio ativo, que é uma pequena fenda onde se liga o substrato. No modelo chave–e–fechadura, a fenda do sítio ativo e o substrato são complementares. No modelo do encaixe-induzido á proteína é mais flexível e se adapta ao substrato.

2. Cada enzima é classificada de acordo com o tipo de reação que catalisa. Existem seis tipos de categorias enzimáticas: oxidorredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases.

3. A cinética enzimática é o estudo quantitativo da catálise por enzimas. De acordo com o modelo de Michaelis–Menten, quando o substrato S liga-se ao sítio ativo de uma enzima E, um complexo de estado de transição é formado. Durante o estado de transição, o substrato é convertido em produto. Após algum tempo, o produto se dissocia da enzima.

4. O número de renovação (K_{cat}) é a medida do número de moléculas de substrato convertidos em produto por unidade por uma enzima quando ela está saturada de substrato. O termo K_{cat}/K_m descreve a eficiência da enzima.

5. A inibição enzimática pode ser reversível ou irreversível. Os inibidores irreversíveis geralmente ligam-se covalentemente às enzimas. Na inibição reversível, o inibidor pode dissociar-se da enzima. Os tipos mais

comuns de inibição reversível são a competitiva, não–competitiva e a incompetitiva.

6. As propriedades cinéticas das enzimas alostéricas não são explicadas pelo modelo de Michaelis–Menten. A maioria das enzimas alostéricas são proteínas multi-subunidades. A ligação do substrato ou efetor a uma subunidade afeta as propriedades de ligação dos outros protômeros.
7. As enzimas empregam os mesmos mecanismos dos catalizadores não-enzimáticos. Vários fatores contribuem para a catálise enzimática: efeitos de proximidade e orientação, efeitos eletrostáticos, catálise ácido–base e catálise covalente. A combinação desses fatores afetam os mecanismos enzimáticos.
8. As cadeias laterais de aminoácidos presentes nos sítios ativos são os principais responsáveis pela transferência de prótons e substituições nucleófilas. Co-fatores não–protéicos (metais e coenzimas) são usados pelas enzimas para catalisar vários tipos de reações.
9. As enzimas são sensíveis aos fatores ambientais como a temperatura e pH. Cada enzima tem uma temperatura ótima e um pH ótimo.
10. As reações químicas nas células vivas são organizadas em uma série de vias bioquímicas. As vias são controladas principalmente pelo ajuste das concentrações e atividades das enzimas por meio do controle genético, modificação covalente, regulação alostérica e compartimentalização.

Capítulo

4

VALTER T. MOTTA

BIOQUÍMICA BÁSICA

Introdução ao Metabolismo

4

Introdução ao Metabolismo

Objetivos

1. Aplicar as leis da termodinâmica às reações bioquímicas.
2. Conceituar entalpia, entropia e energia livre.
3. Identificar o sentido de uma reação enzimática em função do valor da energia livre padrão ou da constante de equilíbrio químico.
4. Descrever as reações acopladas.
5. Conceituar os compostos ricos em energia.
6. Descrever as propriedades do ATP e seu papel no metabolismo.
7. Interrelacionar o anabolismo e catabolismo.
8. Discutir as estratégias intracelulares de regulação do metabolismo.
9. Discutir o controle extracelular do metabolismo em relação a influência hormonal sobre o metabolismo celular.
10. Discutir a produção e o papel dos segundos mensageiros na transdução de sinal.
11. Discutir o mecanismo de ação dos hormônios hidrofóbicos.

Os processos físicos e químicos realizados pelas células vivas envolvem a extração, a canalização e o consumo de energia. Os mamíferos empregam energia química extraída das moléculas de nutrientes (carboidratos, proteínas e lipídeos não-esteróides) para realizar suas funções. Os processos químicos celulares são organizados em forma de uma rede de reações enzimáticas interligadas, nas quais, as biomoléculas são quebradas e sintetizadas com a geração e gasto de energia, respectivamente. Estão relacionadas com:

- A energia liberada nos processos de quebra de moléculas nutrientes orgânicos é conservada na forma de ATP (trifosfato de adenosina) e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato).

Quadro 4.1 Fotossíntese

Os processos fotossintéticos utilizam a energia luminosa captada por moléculas de clorofila para sintetizar carboidratos a partir do dióxido de carbono e água. A clorofila e outros pigmentos das plantas absorvem *fótons* de limitados comprimentos de onda. Quando um fóton é absorvido pela clorofila, os elétrons passam por uma série de transportadores que promovem a sua excitação. A energia dos elétrons excitados é transformada em energia química armazenada nas moléculas de ATP e NADPH formados nas reações de luz da fotossíntese. O ATP e o NADH reduzem então o CO_2 e o convertem a *3-fosfoglicerato* por uma série de reações "no escuro" (ciclo de Calvin). Formam-se hexoses a partir do 3-fosfoglicerato. As hexoses são armazenadas nos vegetais em duas formas principais: *amido* e *sacarose* (açúcar de mesa).

A relação matemática entre o comprimento de onda (λ), freqüência da radiação (ν) e energia dos fótons, *E*, é

$$E = hc/\lambda = h\nu$$

onde *h* é a constante de Planck ($6{,}63 \times 10^{-34}$ J·s) e *c* é a velocidade da luz no vácuo ($2{,}998 \times 10^{8}$ $m \cdot s^{-1}$). As plantas utilizam a energia do sol para transformar o dióxido de carbono e água em glicose ($C_6H_{12}O_6$), oxigênio e calor. A energia química é armazenada na forma de ligações, por exemplo, as ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow 4)$ entre os monômeros de glicose na celulose e nas ligações entre os átomos da própria glicose.

- Biossíntese de macromoléculas a partir de precursores mais simples (unidades monoméricas). Ácidos nucléicos, proteínas, lipídeos e polissacarídeos são sintetizados a partir de nucleotídios, aminoácidos, ácidos graxos e monossacarídios, respectivamente.
- Transporte ativo de moléculas e íons através das membranas em direção contrária a gradientes de concentrações.
- Movimento de células ou de suas partes componentes.

A demanda por energia e a formação de biomoléculas variam conforme a natureza do organismo, do tipo de célula, do interior da célula, de seu estado nutricional e de seu estágio de desenvolvimento. A atividade metabólica celular é regulada de tal modo que as concentrações dos compostos–chave são mantidas dentro de estreitos limites. Em células saudáveis, a biossíntese restaura, em velocidade apropriada, os compostos consumidos. O balanço é atingido pela síntese de enzimas necessárias para a via ou, de modo mais imediato, pela regulação da atividade das enzimas já existentes.

4.1 Ciclo do carbono

A fonte primária de energia empregada pelos seres vivos é a fusão termonuclear dos átomos de hidrogênio para formar hélio que ocorre na superfície solar de acordo com a equação: $4H \rightarrow 1He$ + 2 positrons + energia. (Um positron é uma partícula com a mesma massa de um elétron, mas com carga positiva). A energia radiante da luz solar (radiação eletromagnética) é transportada para a Terra e convertida em energia química por organismos *fotoautotróficos* (plantas verdes e certos microorganismos) através da fotossíntese. A energia química é armazenada na forma de compostos ricos em energia como carboidratos que são sintetizados pela transferência de elétrons da molécula de água para o CO_2. Durante o processo, a maioria dos organismos fotossintéticos libera O_2 na atmosfera.

Os organismos *heterotróficos*, grupo que inclui os animais, diretamente ou indiretamente, obtém todo o material estrutural e a

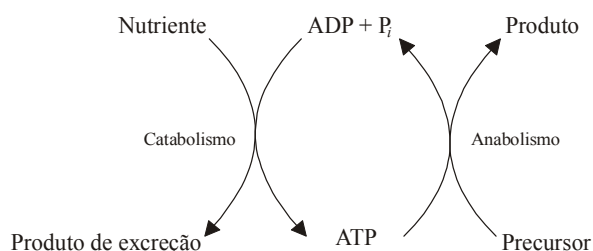
energia a partir de compostos orgânicos produzidos pelos fotoautotróficos. Os produtos da fotossíntese são vitais para os organismos aeróbicos que não contém o aparato molecular para a transformação de energia da luz solar. Esses organismos obtêm energia por meio da oxidação de compostos orgânicos (carboidratos, lipídeos e proteínas) e produzem, entre outros compostos, o CO_2 que retorna à atmosfera para ser, subseqüentemente, utilizado na fotossíntese. Esse ciclo de eventos é denominado *ciclo do carbono.*

4.2 Vias metabólicas

As características dos organismos vivos – sua organização complexa e sua capacidade de crescimento e reprodução – são resultantes de processos bioquímicos coordenados. O *metabolismo* é a soma de todas as transformações químicas que ocorrem nos organismos vivos. São milhares de reações bioquímicas catalisadas por enzimas. As funções básicas do metabolismo celular são: (1) obtenção e utilização de energia, (2) síntese de moléculas estruturais e funcionais, (3) crescimento e desenvolvimento celular e (4) remoção de produtos de excreção.

Conforme os princípios termodinâmicos, o metabolismo é dividido em duas partes:

1. Anabolismo. São os processos biossintéticos a partir de moléculas precursoras simples e pequenas. As vias anabólicas são processos endergônicos e redutivos que necessitam de fornecimento de energia.

2. Catabolismo. São os processos de degradação das moléculas orgânicas nutrientes e dos constituintes celulares que são convertidos em produtos mais simples com a liberação de energia. As vias catabólicas são processos exergônicos e oxidativos.

O catabolismo ocorre em três estágios:

- *Primeiro estágio:* as moléculas nutrientes complexas (proteínas, carboidratos e lipídeos não–esteróides) são quebradas em unidades menores: aminoácidos, monossacarídeos e ácidos graxos mais glicerol, respectivamente.
- *Segundo estágio:* os produtos do primeiro estágio são transformados em unidades simples como a acetil–CoA (acetil coenzima A) que exerce papel central no metabolismo.
- *Terceiro estágio:* a acetil–CoA é oxidada no ciclo do ácido cítrico a CO_2 enquanto as coenzimas NAD^+ e FAD são reduzidas por

quatro pares de elétrons para formar três NADH e um $FADH_2$. As coenzimas reduzidas transferem seus elétrons para o O_2 através da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, produzindo H_2O e ATP em um processo denominado *fosforilação oxidativa.*

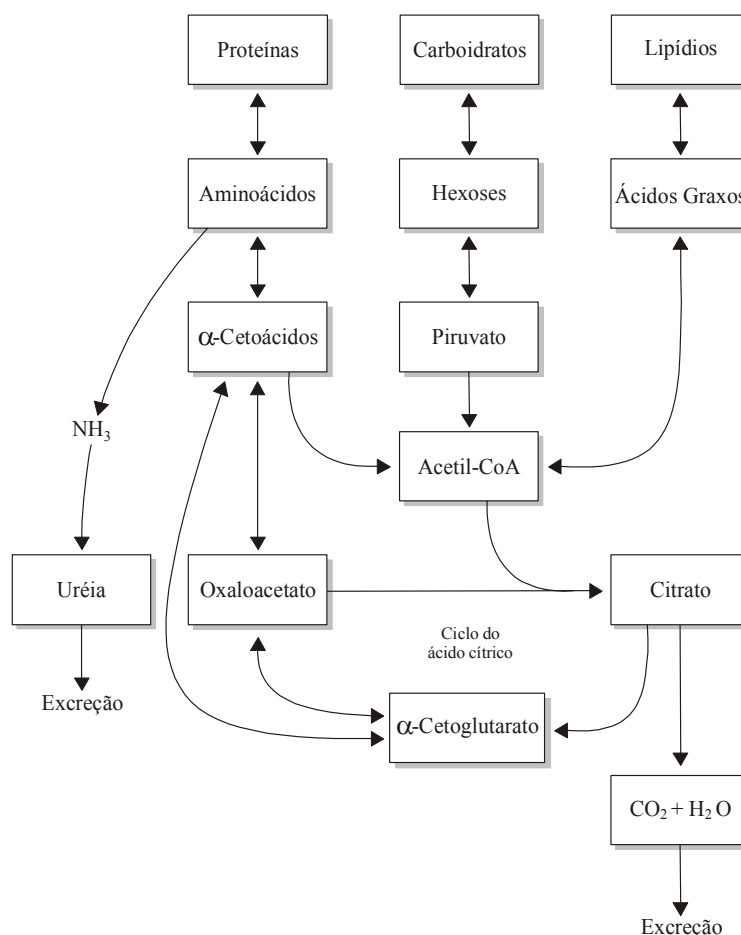



Figura 4.1
Visão geral do catabolismo. Aminoácidos, hexoses e ácidos graxos são formados pela hidrólise enzimática de seus respectivos polímeros (proteínas, carboidratos e lipídeos). Os monômeros são desdobrados em intermediários de dois e três carbonos, como o acetil–CoA e o piruvato que, por sua vez, também são precursores de outros compostos biológicos. A completa degradação dessas moléculas produzem NH_3, CO_2, e H_2O.

A energia livre liberada nas reações catabólicas (exergônicas) é utilizada para realizar processos anabólicos (endergônicos). O catabolismo e o anabolismo estão freqüentemente acoplados por meio do ATP (trifosfato de adenosina) e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida). O ATP é o doador de energia livre para os processos endergônicos. O NADPH é o principal doador de elétrons nas biossínteses redutoras.

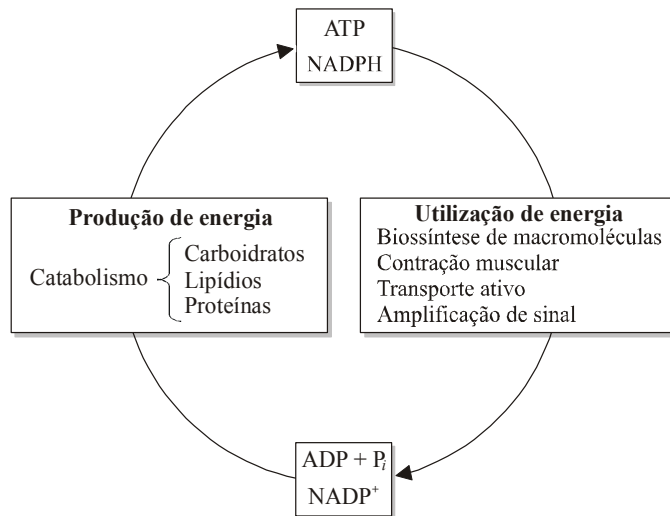



Figura 4.2
Relação entre a produção de energia e a utilização de energia. ATP (trifosfato de adenosina), NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida).

A capacidade dos organismos vivos em regular os processos metabólicos, apesar da variabilidade do meio interno e externo é chamada *homeostase.*

4.3 Termodinâmica e metabolismo

O estudo dos efeitos da energia que acompanham as mudanças físicas e químicas sobre a matéria é conhecido como *termodinâmica.* As leis da termodinâmica são usadas para avaliar o fluxo e o intercambio de matéria e energia. A *bioenergética,* um ramo da termodinâmica, é o estudo de como as reações metabólicas produzem e utilizam energia nos seres vivos e é especialmente útil na determinação da direção e da extensão de cada reação bioquímica. As reações são afetadas por três fatores. Dois deles, a *entalpia* (conteúdo em calor total) e a *entropia* (medida da desordem), estão relacionados com a primeira e segunda lei da termodinâmica, respectivamente. O terceiro fator, chamado *energia livre* (energia capaz de realizar trabalho útil), é derivada da relação matemática entre entalpia e entropia.

As células dos organismos vivos operam como sistemas *isotérmicos* (funcionam à temperatura constante) que trocam energia e matéria com o ambiente. Em termodinâmica, um *sistema* é tudo que está dentro de uma região definida no espaço (exemplo, um organismo). A matéria no restante do universo é chamada de *meio circundante, circunvizinhança* ou *ambiente.* Os organismos vivos são sistemas abertos que jamais estão em equilíbrio com o meio ambiente.

Quadro 4.2 Sistema e meio circundante

Os *princípios de termodinâmica* estão baseados no conceito de um *sistema* e seu *meio circundante*. O sistema pode ser uma reação química, uma célula ou um organismo para os quais os meios circundantes são o solvente da reação, o líquido extracelular (ou matriz) ou o meio ambiente no qual o organismo sobrevive, respectivamente. Trocas de energia e/ou matéria entre o sistema e o meio circundante depende se o sistema é *fechado, isolado* ou *aberto.* Em um sistema fechado, não há troca de matéria ou energia entre o sistema e o meio circundante.

No sistema isolado, somente energia pode ser trocada entre o sistema e o meio circundante. No sistema aberto, ocorre troca de matéria e energia com o meio circundante e mas nunca está em equilíbrio com o mesmo.

Os organismos vivos trocam matéria (ex.: dióxido de carbono e oxigênio) e energia (derivada do metabolismo na forma de calor) com seu meio circundante. As células vivas e os organismos são exemplos de sistemas abertos.

As leis da termodinâmica descrevem as transformações de energia. As duas primeiras são especialmente úteis na investigação das mudanças nos sistemas vivos.

1. Primeira lei da termodinâmica. *Em qualquer mudança física ou química, a quantidade de energia total do sistema e seu meio circundante permanece constante.* Esta lei estipula que a energia pode ser convertida de uma forma para outra, mas não pode ser criada nem destruída. As células são capazes de interconverter energia química, eletromagnética, mecânica e osmótica com grande eficiência. Por exemplo, no músculo esquelético, a energia química do ATP é convertida em energia mecânica durante o processo de contração muscular. É importante reconhecer que a *troca de energia de um sistema depende somente dos estado inicial e final e não do mecanismo da equação.*

2. Segunda lei da termodinâmica. Para formular a segunda lei é necessário definir o termo entropia (do grego, *en,* dentro de + *trope,* curva). A *entropia* (S) *é a medida ou indicador do grau de desordem ou casualidade de um sistema*, ou a energia de um sistema que não pode ser utilizada para realizar trabalho útil.
A entropia é definida em termos de número de arranjos possíveis nas moléculas. A equação para a entropia é

$$S = k_B \ln W$$

Em que k_B é a constante de Boltzmann ($1{,}381 \times 10^{-23}$ mol^{-1}), ln é o logaritmo natural e W o número de arranjos na molécula. A S (entropia) é dada em $J{\cdot}K^{-1}$.

De acordo com a segunda lei, *as reações espontâneas tendem a progredir em direção ao equilíbrio*. Ao atingir o equilíbrio, a desordem (entropia) é a máxima possível sob as condições existentes. A menos que o processo receba energia adicional de uma fonte externa ao sistema, não ocorrerá nenhuma outra mudança espontaneamente.

A. Energia livre

Os organismos vivos necessitam de continuo aporte de energia livre para três processos principais: (1) realização de trabalho mecânico na contração muscular e outros movimentos celulares, (2) transporte ativo de moléculas e íons e (3) síntese de macromoléculas e outras biomoléculas a partir de precursores simples.

A *energia livre de Gibbs* (G) *de um sistema é a parte da energia total do sistema que está disponível para realizar trabalho útil, sob temperatura e pressão constantes*. A variação de energia livre de Gibbs (ΔG) nas condições existentes nos sistemas biológicos é descrita quantitativamente pela equação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

onde ΔG é a variação de energia livre de Gibbs que ocorre enquanto o sistema se desloca de seu estado inicial para o equilíbrio, sob temperatura e pressão constantes, ΔH é a variação de entalpia ou do conteúdo em calor do sistema reagente, T a temperatura absoluta e ΔS a variação de entropia do sistema reagente. As unidades de ΔG e ΔH são joules·mol^{-1} ou calorias mol^{-1} (uma caloria é igual a 4,184 J). As variações da energia livre são acompanhadas pelas concomitantes modificações da entalpia e entropia.

Para a maioria dos casos, o valor de ΔG é obtido medindo-se a variação de energia livre dos estados inicial e final do processo:

$$\Delta G = G_{(\text{produtos})} - G_{(\text{reagentes})}$$

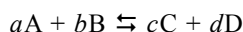
O mecanismo de reação não afeta a ΔG, ou seja, a variação de energia independe da via pela qual ocorre a transformação. *A velocidade de uma reação depende do mecanismo da reação e está relacionada com a energia livre de ativação* ($\Delta G^{\neq}$) e *não com a variação de energia livre* (ΔG). Ou seja, *a* ΔG *não fornece informações sobre a velocidade da reação.*

A variação de energia livre (ΔG) de um processo pode ser *positiva*, *negativa* ou *zero* e indica a direção ou espontaneidade da reação:

- *Reações de equilíbrio.* Os processos que apresentam ΔG igual 0, ($\Delta G = 0$, $K_{eq} = 1{,}0$), não há fluxo em nenhuma direção de reação (as reações nos dois sentidos são iguais).
- *Reações exergônicas.* São os processos que apresentam ΔG negativo ($\Delta G < 0$, $K_{eq} > 1{,}0$) indicando que são energeticamente favoráveis e procederão *espontaneamente* até que o equilíbrio seja alcançado.
- *Reações endergônicas.* São os processos que apresentam ΔG positivo ($\Delta G > 0$, $K_{eq} < 1{,}0$) o que significa que há absorção de energia e são *não-espontâneos* (energeticamente não-favoráveis). O processo ocorrerá espontaneamente na direção inversa à escrita.

B. Relação da ΔG com a constante de equilíbrio

Para uma reação em equilíbrio químico, o processo atinge um ponto no qual, o sistema contém tanto produtos como reagentes. Assim, para a reação:

$$a\text{A} + b\text{B} \leftrightarrows c\text{C} + d\text{D}$$

onde *a, b, c* e *d* são os números de moléculas de A, B, C e D que participam da reação. O composto A reage com B até que as quantidades específicas de C e D sejam formadas. Assim, as concentrações de A, B, C e D não mais se modificam, pois as

velocidades das reações em um ou outro sentido são exatamente iguais. As concentrações dos reagentes e produtos no equilíbrio nas reações reversíveis estão relacionadas pela *constante de equilíbrio,* K_{eq}:

$$K_{eq} = \frac{[C]^c\,[D]^d}{[A]^a\,[B]^b}$$

onde [A], [B], [C] e [D] são as concentrações molares dos componentes da reação no ponto de equilíbrio. A K_{eq} varia com a temperatura.

A variação na energia livre real, ΔG, de uma reação química em temperatura e pressão constantes está relacionada com a constante de equilíbrio dessa reação e, portanto, dependem das concentrações de reagentes e produtos:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln \frac{[C]^c\,[D]^d}{[A]^a\,[B]^b}$$

$\Delta G°$ é a *variação de energia livre padrão,* quando todos os reagentes e produtos da reação estão no estado-padrão: concentração inicial de 1,0 M, temperatura de 25°C e pressão de 1,0 atm. O R é a constante dos gases (8,315 $J{\cdot}mol^{-1}\ K^{-1}$), T é a temperatura absoluta em graus Kelvin (°C + 273) e 1n é o logaritmo natural. $\Delta G°$ é uma constante com valor característico e invariável para cada reação.

Como o valor de ΔG é zero, não existe variação líquida de energia e a expressão é reduzida

$$0 = \Delta G^{\circ} + RT \ln \frac{[C]^c\,[D]^d}{[A]^a\,[B]^b}$$

A equação pode ser reescrita

$$\Delta G° = -RT \ln K_{eq}$$

O 1n pode ser convertido em log na base 10, pela multiplicação por 2,3. Então

$$\Delta G° = -2{,}3RT \log K_{eq}$$

Como a maioria das reações bioquímicas ocorre *in vivo* em pH ao redor de 7,0, a variação de energia livre padrão é designada $\Delta G°'$ com a inclusão de apóstrofo e nomeada "linha". A relação quantitativa entre $\Delta G°'$ e a constante de equilíbrio a 25°C é apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Relação quantitativa entre os valores da constante de equilíbrio (K_{eq}) e as variações de energia livre padrão ($\Delta G^{\circ'}$) em pH 7,0 e 25 ^{0}C′

K'_{eq}	$\Delta G^{\circ'}$ (kJ·mol^{-1})	Direção da reação
1000	−17,1	Ocorre de forma direta
100	−11,4	"
10	−5,7	"
1	0	Equilíbrio
0,1	+5,7	Ocorre de forma inversa
0,01	+11,4	"
0,001	+17,1	"

Quando os reagentes e produtos estão presentes em concentrações iniciais de 1,0 M cada um e temperatura de 37°C, o cálculo da energia livre padrão é dado por

$$\Delta G^{\circ'} = -8{,}315 \times 310 \times 2{,}3 \log K'_{eq}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -5.925 \log K'_{eq}$$

A variação de energia livre real, ΔG, observada para uma dada reação química, é uma função das concentrações e da temperatura existentes durante a reação. A 37°C tem-se:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ'} + 5.925 \log \frac{[\text{produtos}]}{[\text{reagentes}]}$$

Os [produtos] e [reagentes] referem-se às concentrações iniciais reais e não devem ser confundidas com as encontradas no equilíbrio ou em condições padrão.

Sob condições apropriadas, a reação pode ser espontânea (ΔG <0) mesmo quando a variação de energia livre padrão ($\Delta G^{\circ\prime}$) é positiva. Por exemplo, se K' para a reação S ⇆ P for 0,1, então $\Delta G^{\circ\prime}$ a 37 °C será +5.925 kJ mol^{-1}. Entretanto, a reação terá uma ΔG negativa se as concentrações iniciais de S e P forem 0,1 M e 0,001 M, respectivamente:

$$\Delta G = +5.925 + 2{,}3RT \log \frac{0{,}001}{0{,}1}$$

$$\Delta G = +5.925 + (5.925)(-2) = -5.925 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Portanto, o critério de espontaneidade para uma reação é ΔG, e não a $\Delta G^{\circ\prime}$.

4.4 Compostos de "alta energia"

As células obtêm a energia necessária para a sua manutenção e crescimento pela degradação de vários nutrientes, tais como, glicose (carboidrato), aminoácidos (proteínas) e ácidos graxos (lipídeos não–esteróides). Por exemplo, a energia livre padrão liberada durante a oxidação da glicose até CO_2 e H_2O é:

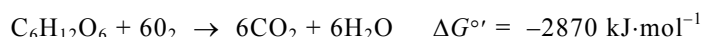
$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O \quad \Delta G°' = -2870\ kJ \cdot mol^{-1}$$

Em condições aeróbicas, a energia liberada na reação acima é utilizada na síntese de, aproximadamente, 32 moléculas de ATP (trifosfato de adenosina) para cada molécula de glicose. O ATP é um carreador ou transportador de energia livre. Outros compostos fosforilados e tioésteres também têm grandes energias livre de hidrólise e, juntamente com o ATP, são denominados de *compostos de "alta energia"* (ou "ricos em energia") (Tabela 4.1). Basicamente, a energia livre liberada pela degradação de nutrientes é convertida em compostos de "alta energia" cuja hidrólise liberam energia livre utilizadas pelas células para exercer suas funções.

Tabela 4.2 – Valores da energia livre padrão ($\Delta G°'$) de hidrólise de alguns compostos de "alta energia".

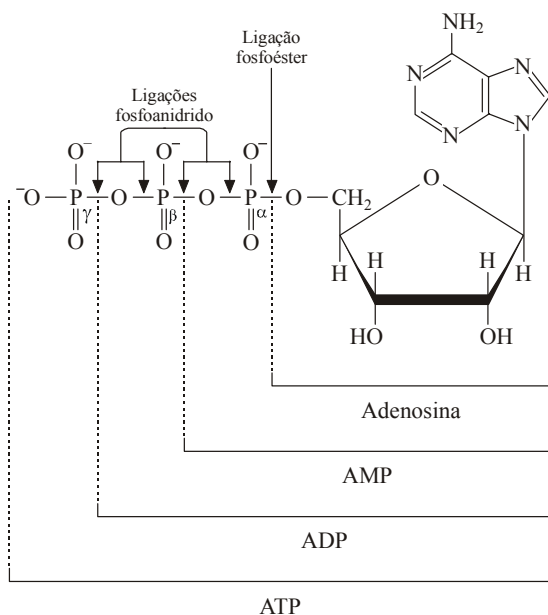
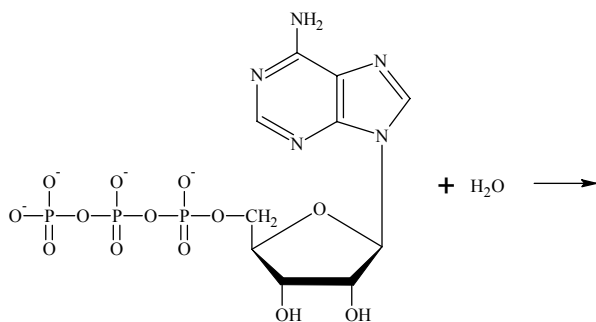
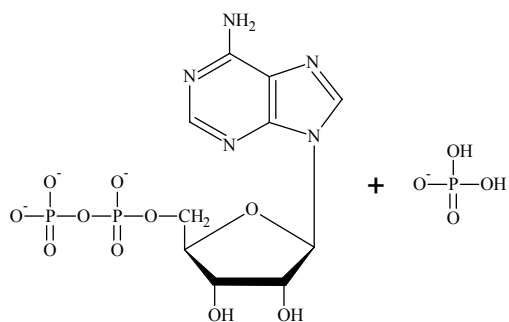
Composto	$\Delta G°'$ ($kJ \cdot mol^{-1}$)
Fosfo*enol*piruvato	-61,9
Carbamoil–fosfato	-51,4
1,3–Difosfoglicerato	-49,3
Creatina–fosfato	-43,1
Acetil–fosfato	-42,2
Acetil–CoA	-31,4
ATP (→ADP + P_i)	-30,5
ATP (→AMP + PP_i)	-32,2
Glicose–1–fosfato	-20,9
Glicose–6–fosfato	-13,8

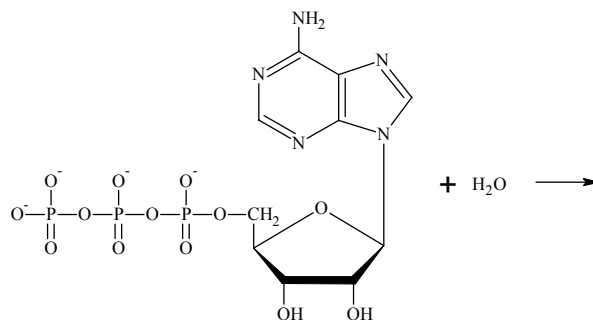
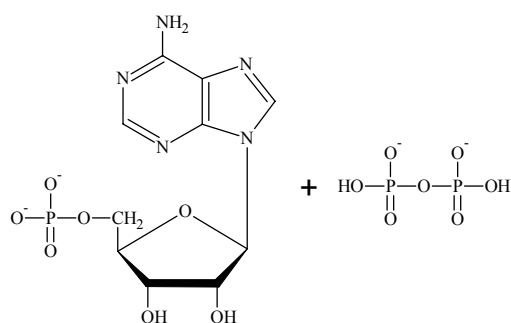
Os valores negativos de $\Delta G°'$ da hidrólise dos compostos apresentados na Tabela 4.2 são denominados de *potencial de transferência de grupos fosfato* e são medidas da tendência dos grupos fosforilados em transferir seus grupos fosfato para a água. Por exemplo, o ATP tem um potencial de transferência de 30,5 comparados com 13,8 para a glicose–6–fosfato. Isso significa que a tendência do ATP em transferir um grupo fosfato é maior que o da glicose 6-fosfato.

Alguns autores representam as ligações de "alta energia" pelo til (~). Deve-se salientar, no entanto, que a energia não reside na ligação específica hidrolisada mas resulta dos produtos de reação que têm menor conteúdo de energia livre que aquele dos reagentes.

A. Trifosfato de adenosina (ATP)

A energia livre liberada pelas reações de degradação de moléculas combustíveis em processos exergônicos, é conservada na forma de intermediários de "alta energia". O intermediário central de "alta energia" é a *trifosfato de adenosina* (ATP) cuja hidrólise exergônica impulsiona processos endergônicos.

O ATP é um nucleotídio formado por uma unidade de adenina, uma de ribose e três grupos fosfato seqüencialmente ligados por meio de uma ligação *fosfoéster* seguida de duas ligações *fosfoanidrido*. As formas ativas do ATP e ADP estão complexadas com o Mg^{2+} ou outros íons. Estrutura de ATP:

As ligações fosfoanidrido (fosfato–oxigênio) do ATP tem alta energia livre de hidrólise. Ocorrem dois tipos de clivagem do ATP: a ortofosfato (ATP → ADP + P_i):

Trifosfato de adenosina (ATP)

Difosfato de adenosina (ADP) Fosfato inorgânico (P_i)

e a pirofosfato (ATP → AMP + PP_i):

Trifosfato de adenosina (ATP)

Adenosina monofosfato (AMP) Pirofosfato (PP_i)

O elevado potencial de transferência de grupos fosfato do ATP é explicada por várias razões:

- *Repulsões eletrostáticas mútuas.* Na faixa de pH fisiológico, o ATP tem 4 cargas negativas (o ADP tem 3) que se repelem vigorosamente. Por hidrólise, o ATP produz ADP e P_i que é mais estável pela redução da repulsão eletrostática em relação ao ATP. Os íons Mg^{2+} neutralizam parcialmente as cargas negativas do ATP tornando a sua hidrólise menos exergônica.

- *Estabilização por ressonância.* Os produtos de hidrólise do ATP – o ADP ou o AMP – são mais estáveis que o ATP pela capacidade de rapidamente oscilar entre diferentes estruturas. O ADP tem maior estabilidade por ressonância da ligação fosfoanidro que o ATP.

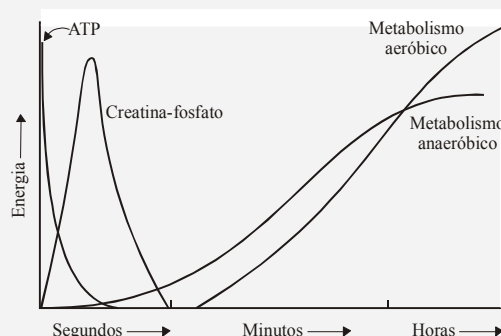
- *Energia de solvatação do anidrido fosfórico.* A menor energia de solvatação do anidrido fosfórico quando comparada aos seus produtos de hidrólise, fornece a força termodinâmica que impulsiona a sua hidrólise.

A variação de energia livre ($\Delta G°'$) de hidrólise do ATP a ADP e fosfato é –30,5 $kJ \cdot mol^{-1}$ em condições padrão (1,0 M para o ATP, ADP e P_i). Entretanto, intracelularmente, não são encontradas concentrações padrão e sim quantidades reais. Nessas condições, a variação de energia livre de hidrólise do ATP depende em parte da concentração dos reagentes e produtos na célula como também do pH e da força iônica. No entanto, para simplificar os cálculos, será empregado o valor –30,5 $kJ \cdot mol^{-1}$ para a hidrólise do ATP, mesmo reconhecendo, que este é um valor mínimo.

Quadro 4.3 Creatina–fosfato

A creatina–fosfato tem energia livre padrão de hidrólise –43,1 kJ·mol^{-1}, portanto, mais negativa que o ATP. O músculo esquelético dos vertebrados emprega a creatina–fosfato como um veículo para o transporte de energia da mitocôndria para as miofibrilas. Quando a concentração mitocondrial de ATP está elevada (célula em repouso), a enzima *creatino–cinase* cataliza a fosforilação reversível da creatina pelo ATP. A creatina–fosfato resultante difunde da mitocôndria para as miofibrilas onde a enzima creatino–cinase opera na direção termodinamicamente favorável para gerar ATP. Durante o exercício muscular, quando o teor de ATP é baixo, ocorre a síntese de ATP a partir de creatina–fosfato e de ADP.

Creatina-fosfato + ADP + H^+ ⇆ ATP + creatina

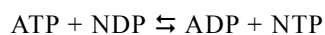
O músculo esquelético em repouso possui creatina–fosfato suficiente para suprir as necessidades de energia por alguns minutos. No entanto, sob condições de máximo esforço, esse período é reduzido para apenas alguns segundos.

Fontes de ATP durante o exercício. Nos segundos iniciais, o exercício é mantido pelos compostos fosforilados de "alta" energia (ATP e creatina–fosfato). Subsequentemente, o ATP é regenerado pelas vias metabólicas.

O ATP pode ser regenerado por dois mecanismos:

- *Fosforilação ao nível do substrato.* É a transferência direta do grupo fosfato (P_i) para o ADP (ou outro nucleosídeo 5'–difosfato) para formar ATP, empregando a energia livre proveniente de processos exergônicos.
- *Fosforilação oxidativa.* O processo no qual os elétrons liberados durante a oxidação de substratos (reações de degradação) são transferidos para a *cadeia mitocondrial transportadora de elétrons* através de coenzimas reduzidas (NADH e $FADH_2$) para o oxigênio molecular. A energia livre liberada promove a síntese de ATP a partir de ADP e P_i. (*Ver* Capítulo 8).

B. Outros nucleotídeos 5'-trifosfatos

Outros nucleotídeos 5'–trifosfatos (NTPs) apresentam energia livre de hidrólise equivalente ao ATP. Suas concentrações intracelulares são baixas o que restringe a sua função. Vários processos biossintéticos, como a síntese de glicogênio, proteínas e ácidos nucléicos necessitam de outros trifosfatos de nucleosídeos. A enzima inespecífica *nucleosídeo–difosfato–cinase* catalisa a síntese (fosforilação) de NTPs (CTP, GTP, TTP, UTP) a partir do ATP e dos NDPs (nucleosídeos difosfatos) correspondentes:

ATP + NDP ⇆ ADP + NTP

A energia livre padrão liberada é -218 kJ·mol^{-1} na transferência de um par de elétrons do NADH até o oxigênio molecular na cadeia respiratória mitocondrial. A energia liberada é suficiente para sintetizar três ATP a partir de 3ADP e 3P_i (3 x 30,5 = 91,5 kJ·mol^{-1}).

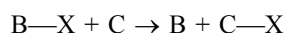
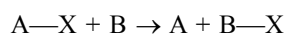
4.5 Reações acopladas

Reações termodinamicamente desfavoráveis são impulsionadas por reações exergônicas à qual estão acopladas. As reações exergônicas fornecem energia que dirigem as reações endergônicas. A interconexão entre reações endergônicas e exergônicas é chamada *acoplamento*.

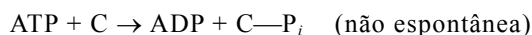
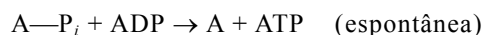
Podem ocorrer duas formas de acoplamento:

1. Através de um intermediário comum. A energia gerada por uma reação biológica ou processo muitas vezes impulsiona uma segunda reação que não ocorre espontaneamente. O acoplamento pode ocorrer através de um intermediário comum (B—X):

$$\text{A—X} + \text{B} \rightarrow \text{A} + \text{B—X}$$

$$\text{B—X} + \text{C} \rightarrow \text{B} + \text{C—X}$$

A soma das variações de energia livre deve ser negativa para o desenvolvimento das reações. O fluxo de energia no metabolismo de muitas reações está acoplado com o ATP que atua como intermediário carreador de energia:

$$\text{A—P}_i + \text{ADP} \rightarrow \text{A} + \text{ATP} \quad \text{(espontânea)}$$

$$\text{ATP} + \text{C} \rightarrow \text{ADP} + \text{C—P}_i \quad \text{(não espontânea)}$$

Assim, uma reação termodinamicamente desfavorável (endergônica) torna-se altamente favorável pelo acoplamento à hidrólise de moléculas de ATP.

2. Através da transferência de grupos químicos. Os carreadores mais importantes são: (a) o *ATP* (e outros nucleosídeos 5′–trifosfatos) na transferência de grupos fosfato; (b) tioésteres como a *coenzima A* (CoA–SH) que carreiam o grupo acetil na forma de acetil-CoA – produto comum do catabolismo de carboidratos, de ácidos graxos e de aminoácidos – e de outros grupos acila; (c) o *NAD(P)H* que transporta íons hidrogênio e elétrons provenientes das reações de oxidação (catabólicas).

Resumo

1. Todos os organismos vivos necessitam de energia. Através da bioenergética – estudo das transformações de energia – a direção e a extensão pela qual as reações bioquímicas são realizadas podem ser determinadas. A entalpia (uma medida do conteúdo calórico) e a entropia (uma medida de desordem) estão relacionadas com a primeira e a segunda lei da termodinâmica, respectivamente. A energia livre (a fração da energia total disponível para a realização de trabalho) está relacionada matematicamente com a entalpia e a entropia.

2. As transformações de energia e calor ocorrem em um "universo" composto de um sistema e de seu meio circundante. Em um sistema aberto, matéria e energia são intercambiáveis entre o sistema e seu meio circundante. O sistema é denominado fechado quando a energia mas não a matéria é trocada com o meio circundante. Os organismos vivos são sistemas abertos.

3. A energia livre representa o máximo de trabalho útil obtido em um processo. Processos exergônicos, onde a energia livre diminui ($\Delta G < 0$) são espontâneos. Se a variação de enrgia livre é positiva ($\Delta G < 0$), o

processo é chamado endergônico. Um sistema está em equilíbrio quando a variação de energia livre é zero. A energia livre padrão ($\Delta G°$) é definida para reações a 25°C, pressão de 1 atm e concentrações de 1 M. O pH padrão na bioenergética é 7. A variação de energia livre padrão $\Delta G°'$ em pH 7 é normalmente empregada nos textos bioquímicos.

4. A hidrólise do ATP fornece a maioria da energia livre necessária para os processos da vida.

Referências

BLACKSTOCK, J. C, **Biochemistry.** Oxford: Butterworth, 1998. p. 164-91.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica.** 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 269-96.

STRYER, L. **Bioquímica.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. p. 419-36.

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica.** Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 353-81.

Capítulo

5

VALTER T. MOTTA

BIOQUÍMICA BÁSICA

Carboidratos

5

Carboidratos

Objetivos

1. Classificar um monossacarídeo por meio do número de carbonos de sua molécula.
2. Identificar se um monossacarídeo pertence à série D ou L pela sua estrutura acíclica.
3. Identificar os isômeros α e β na estrutura cíclica dos monossacarídeos.
4. Compreender a estrutura da glicose na sua forma monomérica e polimérica.
5. Identificar os tipos de ligações existentes entre os monossacarídeos nos oligossacarídeos e polissacarídeos.
6. Identificar as estruturas da maltose, sacarose e lactose, indicando-lhes a nomenclatura.

Os carboidratos (glicídeos ou sacarídeos) são as principais fontes alimentares para produção de energia além de exercerem inúmeras funções estruturais e metabólicas nos organismos vivos. São substâncias que contêm carbono, hidrogênio e oxigênio de acordo com a fórmula geral $[CH_2O]_n$ onde $n \geq 3$ e ocorrem como compostos simples e complexos. São poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas, ou ainda, substâncias que por hidrólise formam aqueles compostos. São classificados como: *monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos* e *polissacarídeos* de acordo com o número de unidades de açúcares simples que contém. Os carboidratos ligados covalentemente a proteínas e lipídeos são denominados *glicoconjugados* e estão distribuídos em todos os seres vivos, mais notadamente entre os eucariontes. Alguns carboidratos (ribose e desoxirribose) fazem parte da estrutura dos nucleotídeos e dos ácidos nucléicos.

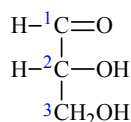
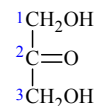
Os carboidratos também participam de vários processos biológicos como a transdução de sinal, interações célula–célula e endocitose que envolvem tanto os glicoconjugados como as glicoproteínas, os glicolipídeos ou as moléculas de carboidratos livres.

5.1 Monossacarídeos

Os monossacarídeos (oses ou açúcares simples) são as unidades básicas dos carboidratos. São constituídos por uma unidade de poliidroxialdeído ou de poliidroxicetona contendo três a nove átomos de carbono, sendo o principal combustível para a maioria dos seres vivos. Os monossacarídeos mais simples são as *trioses* (três átomos de carbono): *gliceraldeído* e *diidroxiacetona.*

H–¹C=O
H–²C—OH
³CH_2OH

Gliceraldeído

¹CH_2OH
²C=O
³CH_2OH

Diidroxiacetona

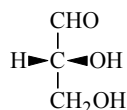
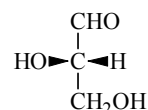
Os monossacarídeos são classificados de acordo com a natureza química do grupo carbonila e pelo número de seus átomos de carbono. Os que têm grupos aldeídicos são *aldoses* e os que têm grupos cetônicos, formam as *cetoses.* Os monossacarídeos com quatro átomos de carbono são denominados *tetroses*; com cinco, *pentoses*; com seis *hexoses* etc. Por exemplo, o gliceraldeído é uma aldotriose e a diidroxiacetona, uma cetotriose. De modo geral, diferenciam-se os nomes próprios das cetoses pela inserção de *ul* aos nomes das aldoses correspondentes, como, por exemplo, tetr*ul*ose, pent*ul*ose, hex*ul*ose etc.

A. Configuração dos monossacarídeos

Com exceção da diidroxiacetona, todos os monossacarídeos possuem átomos de carbono assimétricos (quirais). Para o gliceraldeído, o C2 é o centro assimétrico que origina dois estereoisômeros: o D–gliceraldeído e L–gliceraldeído. São *enatiômeros* (imagens especulares) um do outro:

CHO
H►C◄OH
CH_2OH

D-Gliceraldeído

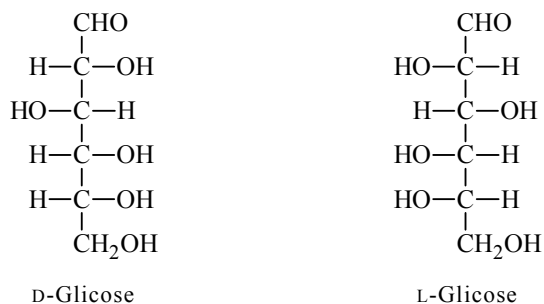
CHO
HO►C◄H
CH_2OH

L-Gliceraldeído

As outras aldoses são série D e L com respeito ao D–gliceraldeído e o L-gliceraldeído. Isto significa que todos os açúcares com a mesma configuração do D–gliceraldeído e, portanto, com a mesma configuração no *centro assimétrico* mais afastado do grupo carbonila, são da série D. As aldoses que representam a configuração do L-gliceraldeído são da série L. O mesmo ocorre com as cetoses com mais de quatro átomos de carbonos. Em geral, as moléculas com *n* centros assimétricos podem ter 2^n estereoisômeros. As aldoses com

seis carbonos têm quatro centros de assimetria e assim há $2^4 = 16$ estereoisômeros possíveis (oito na série D e oito na série L). As Figuras 5.1 e 5.2 mostram as relações estereoquímicas das D-aldoses e D–cetoses conhecidas como projeções de Fisher. Nessas estruturas, o esqueleto dos carboidratos está orientado verticalmente com o carbono mais oxidado geralmente no topo.

As aldoses e cetoses da série L são imagens especulares de seus correspondentes da série D:

```
      CHO                 CHO
       |                   |
   H—C—OH             HO—C—H
       |                   |
  HO—C—H               H—C—OH
       |                   |
   H—C—OH             HO—C—H
       |                   |
   H—C—OH             HO—C—H
       |                   |
      CH2OH               CH2OH

   D-Glicose            L-Glicose
```

As propriedades ópticas dos monossacarídeos são designadas pelos sinais (+), dextrorrotatória e (−), levorrotatória.

Estereoisômeros que não são enantiômeros são chamados *diastereoisômeros*. Os açúcares D–ribose e D–arabinose são diastereoisômeros por serem isômeros mas não imagens especulares. Os diastereoisômeros que diferem na configuração ao redor de um único C são denominados *epímeros*. A D–glicose e a D–galactose são epímeros porque diferem somente na configuração do grupo OH no C4. A D–manose e a D–galactose não são epímeros pois suas configurações diferem em mais de um carbono.

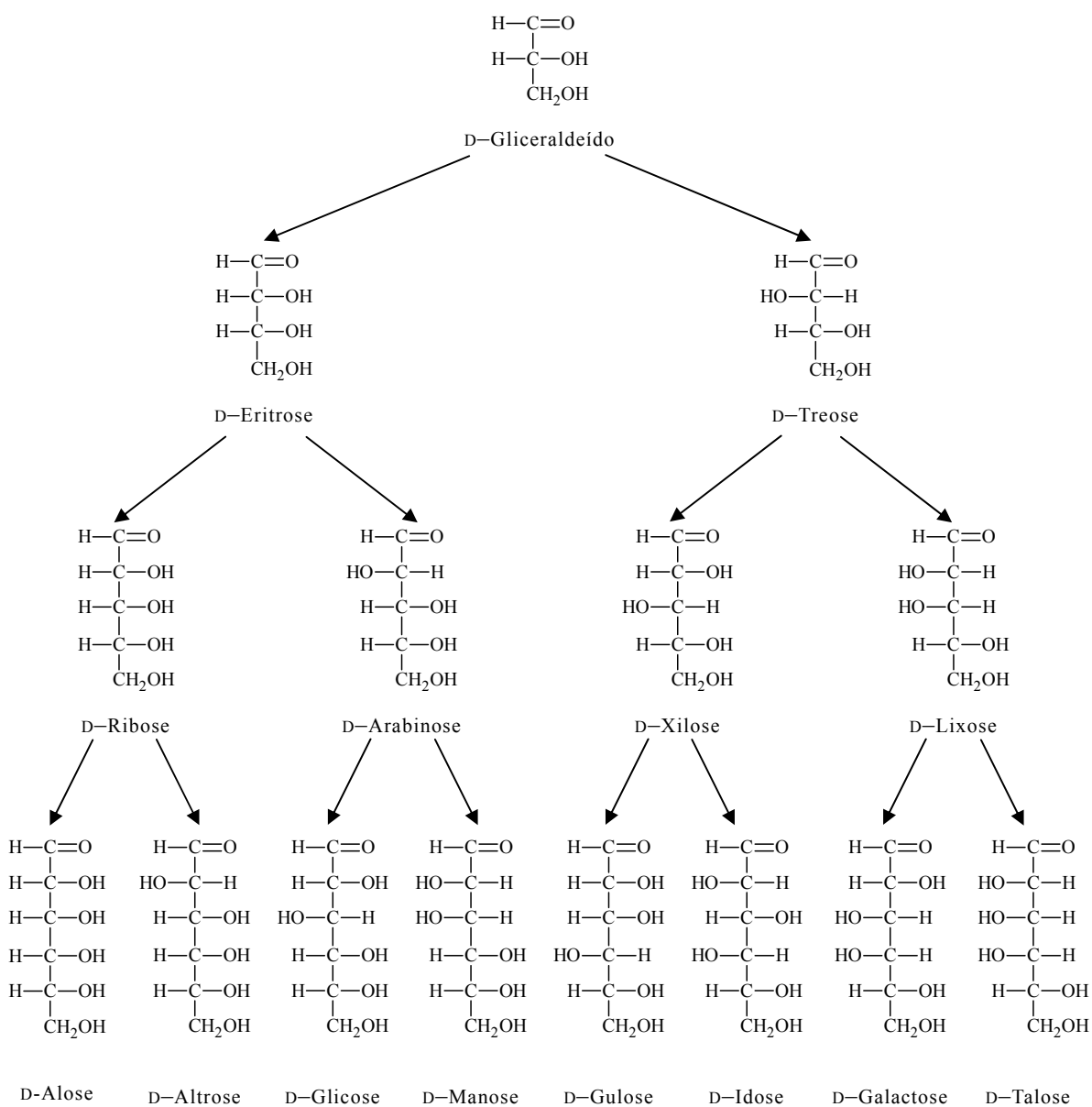



Figura 5.1
Relações estereoquímicas das D-aldoses com três a seis átomos de carbono. As D-aldoses contêm grupamentos aldeído no C1 e têm a configuração do D–gliceraldeído no seu centro assimétrico mais afastado do grupo carbonila. A configuração em torno do C2 distingue os membros de cada par.

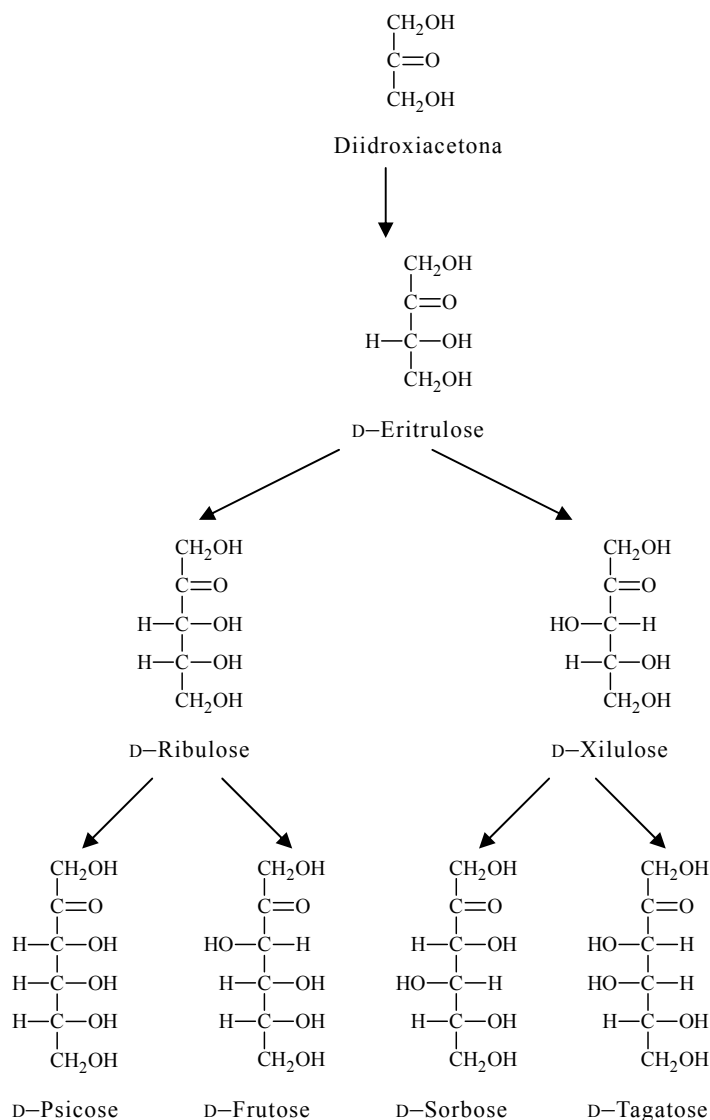



Figura 5.2
Relações estereoquímicas das D-cetoses com três a seis átomos de carbono. As D–cetoses contêm grupamentos cetônicos no C2 e têm a configuração do D–gliceraldeído no seu centro assimétrico mais afastado do grupo carbonila. A configuração em torno do C3 distingue os membros de cada par.

B. Ciclização de monossacarídeos

Em solução aquosa menos de 1% das aldoses e cetoses se apresentam como estruturas de cadeia aberta (acíclica) mostradas nas Figuras 5.1 e 5.2. Os monossacarídeos com cinco ou mais átomos de carbono ciclizam-se, formando anéis pela reação de grupos alcoólicos com os grupos carbonila dos aldeídos e das cetonas para formar *hemiacetais* e *hemicetais,* respectivamente. A reação de ciclização intramolecular torna os monossacarídeos espécies mais estáveis

Por ciclização, os monossacarídeos com mais de cinco átomos de carbono não apresentam o grupo carbonila livre, mas ligado

covalentemente com uma das hidroxilas presentes ao longo da sua cadeia. O aldeído em C1 na forma em cadeia aberta da glicose reage com a hidroxila em C5, produzindo um anel com seis átomos (5 carbonos e 1 oxigênio), denominado de *piranose* devido à sua analogia ao *pirano*. As aldopentoses (ribose) e cetohexoses (frutose) formam anéis pentagonais (4 carbonos e 1 oxigênio) chamados de *furanose* em analogia com o *furano* (Figura 5.3 e 5.4).

As estruturas piranose e furanose são hexágonos e pentágonos regulares conhecidas como *fórmulas em perspectiva de Haworth.* O anel heterocíclico é representado perpendicular ao plano do papel, enquanto os grupos presentes nas fórmulas lineares à direita estão projetados "abaixo" do plano do anel e os que estão à esquerda ficam "acima". Ocorrem exceções, como a observada com o H do C5 que está abaixo do plano do anel devido à torção necessária para fechá-lo.

D-Glicose
(Projeção de Fisher)

α-D-Glicopiranose
(Projeção de Haworth)

ou

β-D-Glicopiranose
(Projeção de Haworth)

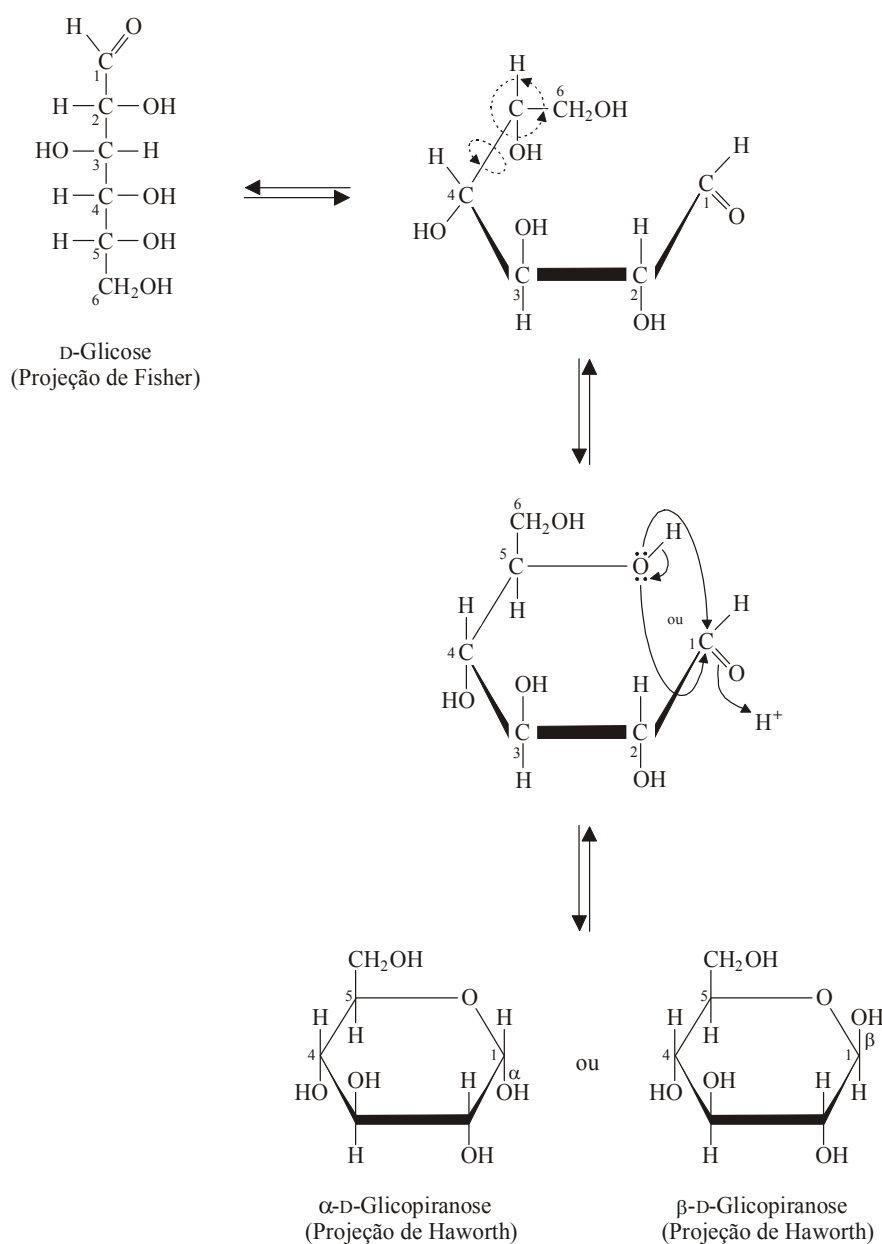



Figura 5.3
Ciclização da D-glicose com formação de duas estruturas cíclicas de glicopiranose. A projeção de Fisher (no alto à esquerda) é rearranjada em uma representação tridimensional (no alto à direita). A rotação da ligação entre C4 e C5 aproxima o grupo hidroxila em C5 do grupo aldeído em C1 para formar uma ligação hemiacetal, produzindo dois estereoisômeros, os anômeros α e β que diferem na posição da hidroxila do C1 (no anômero α o grupo OH é representado para baixo e no anômero β o grupo OH é representado para cima). As formas glicopiranosídicas são mostradas como projeção de Haworth, nas quais as ligações mais escuras do anel são projetadas à frente do plano do papel e as ligações mais claras do anel são projetadas para trás.

O carbono carbonila (C1 das aldoses ou o C2 das cetoses) do monossacarídeo cíclico é designado *carbono anomérico* e constitui

um centro de assimetria adicional com duas configurações possíveis. No caso da glicose, as duas formas resultantes são α–D–glicose e β–D–glicose (Figura 5.3). No anômero α, o grupo OH ligado ao carbono anomérico (C1) está abaixo do plano do anel; no anômero β está projetado acima do plano do anel. As formas α e β são *anômeras*.

Quando em solução aquosa, a α–D–glicose e β–D–glicose se interconvertem livremente para atingir uma mistura de equilíbrio que contém 63,6% do anômero β, 36,4% do anômero α e 1% da forma aberta linear. A interconversão é detectada por alterações na rotação óptica e é chamada *mutarrotação*. Esse fenômeno também é observado em outras pentoses e hexoses.

Nas estruturas cíclicas dos monossacarídeos os átomos de carbono anoméricos (C1 nas aldoses e C2 nas cetoses) são susceptíveis de oxidação por vários agentes oxidantes contendo íons cúpricos (Cu^{2+}), como as soluções de Fehling ou Benedict. Assim, os monossacarídeos com átomos de carbonos anoméricos livres, são designados *açúcares redutores;* os envolvidos por ligações glicosídicas, são chamados *açúcares não–redutores*.

Os monossacarídeos como a frutose e a ribose ciclizam-se para formar estruturas furanóscas.

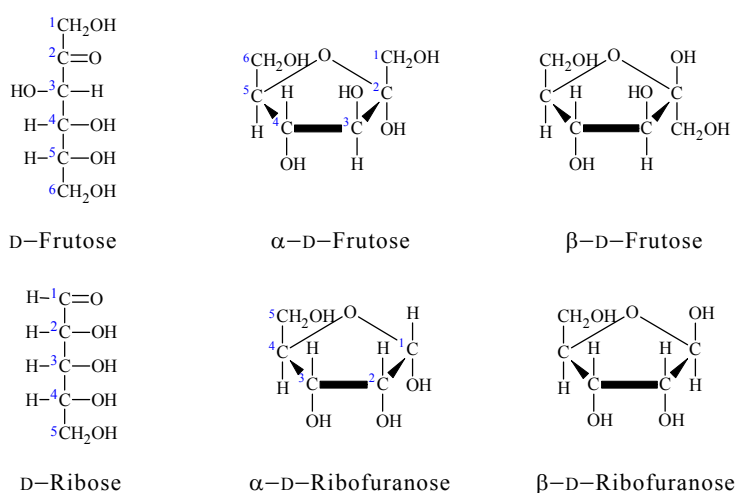
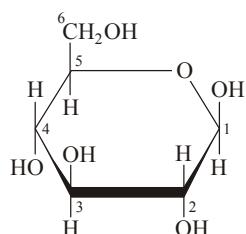
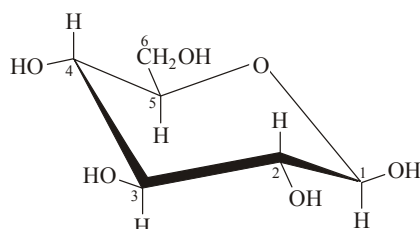
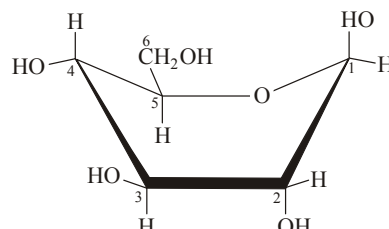
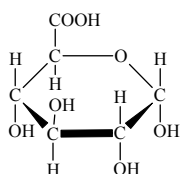
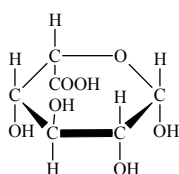
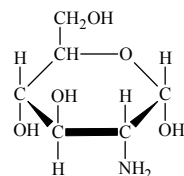
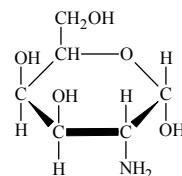
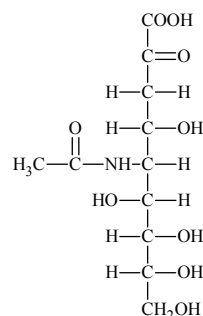



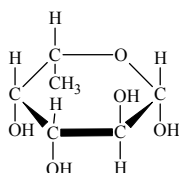
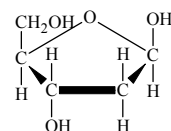
Figura 5.4
Ciclização da frutose e da ribose

Tanto as hexoses como as pentoses podem assumir as formas de piranose ou de furanose nas fórmulas em perpectiva de Haworth. No entanto, o anel da piranose pode assumir uma corformação de cadeira ou de barco:

Projeção de haworth — Conformação de cadeira — Conformação de barco

C. Derivados de monossacarídeos

Os açúcares simples podem ser convertidos em compostos químicos derivados. Muitos deles são componentes metabólicos e estruturais dos seres vivos.

1. Ácidos urônicos. Os ácidos urônicos são formados quando o grupo terminal CH_2OH dos monossacarídeos são oxidados. Dois ácidos urônicos são importantes nos mamíferos: o ácido d–glicurônico e seu epímero, o ácido L–idurônico. Nos hepatócitos, o ácido glicurônico combina-se com moléculas de esteróides, certos fármacos e bilirrubina (um produto de degradação da hemoglobina) para aumentar a solubilidade em água. O processo permite a remoção de produtos do corpo. Tanto o ácido glicurônico como o ácido L–idurônico são carboidratos abundantes no tecido conjuntivo.

Ácido α-D-glicurônico — Ácido β-L-idurônico

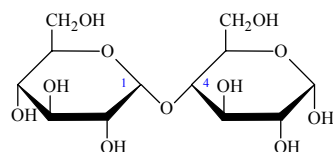
2. Aminoaçúcares. Nos aminoaçúcares um grupo hidroxila (mais comumente no carbono 2) é substituído por um grupo amino. Esses compostos são constituintes comuns dos carboidratos complexos encontrados associados a lipídeos e proteínas celulares. Os mais freqüentes são: a D–glicosamina e a D–galactosamina. Os aminoaçúcares muitas vezes estão acetilados. O ácido *N*–acetilneuramínico (a forma mais comum de ácido siálico) é um produto de condensação da *N*-acetilmanosamina e do ácido pirúvico. Os ácidos siálicos são cetoses contendo nove átomos de carbonos que podem ser amidados com ácido acético ou glicolítico (ácido hidroxiacético). São componentes das glicoproteínas e glicolipídeos.

α–D–Glicosamina

α–D–Galactosamina

Ácido siálico (ácido *N*–acetilneuramínico)

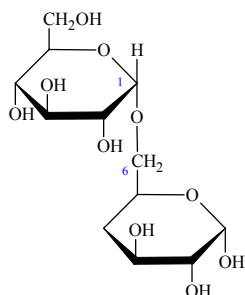
3. Desoxiaçúcares. Nos desoxiaçúcares um grupo –OH é substituído por H. Dois importantes desoxiaçúcares encontrados nas células são: a L–fucose (formado a partir da D–manose por reações de redução) e a 2–desoxi–D–ribose. A fucose é encontrada nas glicoproteínas que determinam os antígenos do sistema ABO de grupos sangüíneos na superfície dos eritrócitos. A desoxirribose é componente do DNA.

β-L-Fucose

β-D-Desoxirribose

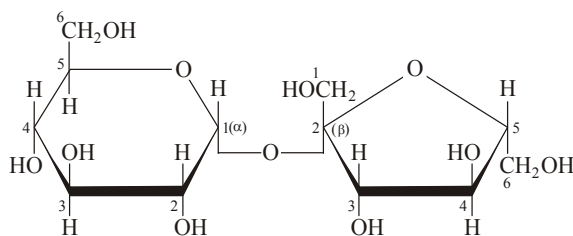
5.2 Dissacarídeos e oligossacarídeos

Quando ligados entre si por uma *ligação O–glicosídica*, (formada por um grupo hidroxila de uma molécula de açúcar com o átomo de carbono anomérico de outra molécula de açúcar) os monossacarídeos formam uma grande variedade de moléculas. Os dissacarídeos são glicosídeos compostos por dois monossacarídeos (como a maltose, a lactose e a sacarose). Os oligossacarídeos são polímeros relativamente pequenos que consistem de dois a dez (ou mais) monossacarídeos. Os átomos de carbonos anoméricos quando participantes de ligações glicosídicas não são oxidados pelos íons cúpricos.

A. Dissacarídeos

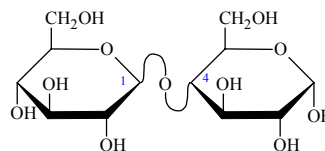
1. Maltose. A maltose é obtida de hidrólise do amido e consiste de dois resíduos de glicose em uma ligação glicosídica α(1→4) onde o C1 de uma glicose liga-se ao C4 de outra glicose. O segundo resíduo de glicose da maltose contém um átomo de carbono anomérico livre (C1), capaz de existir na forma α ou β−piranosídica, sendo assim, um açúcar redutor, além de apresentar atividade óptica (mutarrotação).

Maltose, ligação α(1→4)

A isomaltose é um dissacarídio onde a ligação é formada entre o C1 de um resíduo de glicose e o C6 de outra, constituindo uma ligação glicosídica α(1→6). A isomaltose também contém átomo de carbono anomérico livre.

Isomaltose, ligação α(1→6)

2. Sacarose. A sacarose (açúcar comum extraído da cana) é constituída pela união de uma α-D-glicose com a β−D−frutose, pela ligação glicosídica α,β(1→2) indicando que a ligação ocorre entre os carbonos anoméricos de cada açúcar (C1 na glicose e C2 na frutose). A sacarose é um açúcar não-redutor por não ter terminação redutora livre. Não apresenta, também, atividade óptica (mutarrotação), pois não contém carbono anomérico livre.

Glicose Frutose

Sacarose

3. Lactose. A lactose é encontrada apenas no leite, sendo formada pela união do C1 da β−D−galactose com o C4 da D−glicose, numa

ligação glicosídica β(1→4). Apresenta mutarrotação e capacidade redutora por possuir carbono anomérico livre na glicose.

Lactose, ligação β(1→4)

B. Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são pequenos polímeros muitas vezes encontrados ligados a polipeptídeos e a glicolipídeos. Existem duas classes de oligossacarídeos: os *N*–ligados e os *O*–ligados. Os oligossacarídeos *N*–ligados estão unidos a polipeptídeos por uma ligação *N*–glicosídica com o grupo amino da cadeia lateral do aminoácido asparagina. Os oligossacarídeos *O*–ligados estão unidos pelo grupo hidroxila da cadeia lateral do aminoácido serina ou treonina nas cadeias polipeptídicas ou pelo grupo hidroxila dos lipídeos de membrana.

5.3 Polissacarídeos

Os *polissacarídeos* (ou *glicanos*) são formados por longas cadeias de unidades de monossacarídeos unidas entre si por ligações glicosídicas. São insolúveis em água e não tem sabor nem poder redutor. São classificados como:

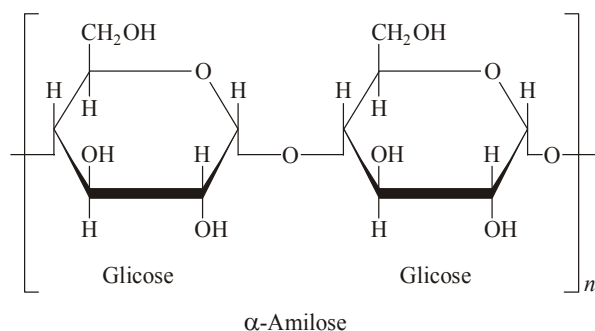
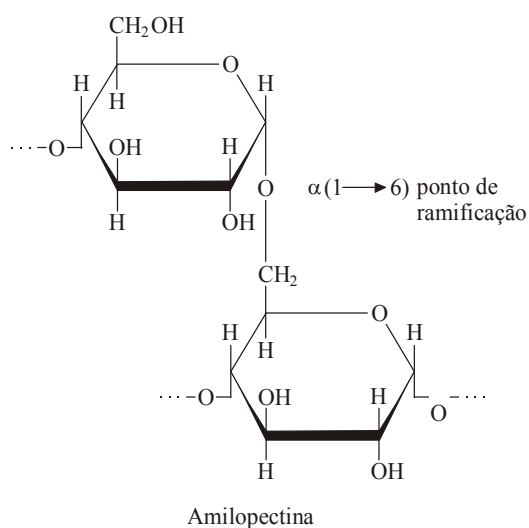
- *Homopolissacarídeos* (homoglicanos) contêm apenas um único tipo de monossacarídeo, por exemplo, amido, glicogênio e celulose.
- *Heteropolissacarídeos* (heteroglicanos) contêm dois ou mais tipos diferentes de monossacarídeos, por exemplo, ácido hialurônico, condroitina sulfato, dermatana sulfato e heparina.

A. Homopolissacarídeos

São polímeros de carboidratos formados apenas por um único tipo de monossacarídeo.

1. Amido. O *amido* é um homopolissacarídeo depositado nos cloroplastos das células vegetais como grânulos insolúveis. É a forma de armazenamento de glicose nas plantas e é empregado como combustível pelas células do organismo. É constituído por uma mistura de dois tipos de polímeros da glicose:

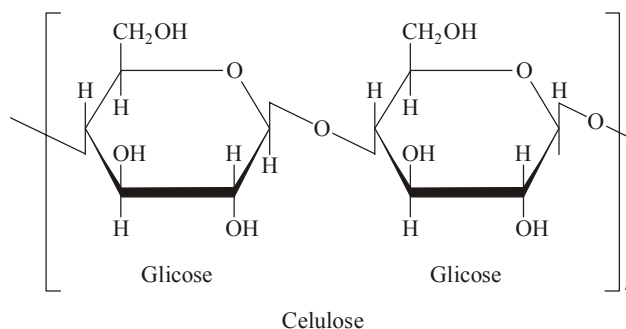
- *Amilose.* São polímeros de cadeias longas de resíduos de α–D–glicose unidos por ligações glicosídicas α(1→4).

α-Amilose

- *Amilopectina.* É uma estrutura altamente ramificada formada por resíduos de α−D−glicose unidos por ligações glicosídicas α(1→4), mas, também, por várias ligações α(1→6) nos pontos de ramificação, que ocorrem entre cada 24-30 resíduos. Esses polímeros têm tantas extremidades não-redutoras quantas ramificações, porém apenas uma extremidade redutora.

Amilopectina

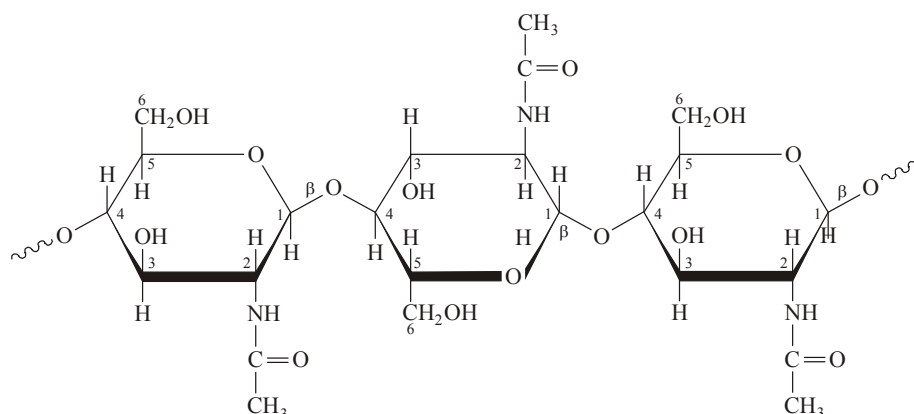
2. Glicogênio. É a mais importante forma de polissacarídio de reserva da glicose das células animais. A estrutura do glicogênio assemelha-se à da amilopectina, exceto pelo maior número de ramificações que ocorrem em intervalos de 8−12 resíduos de glicose (na amilopectina os intervalos das ramificações são de 24-30 resíduos de glicose). Essa estrutura altamente ramificada, torna suas unidades de glicose mais facilmente mobilizáveis em períodos de necessidade metabólica. O glicogênio está presente principalmente no músculo esquelético e no fígado, onde ocorre na forma de grânulos citoplasmáticos.

Tabela 5.1 – Comparação da amilose, amilopectina e glicogênio

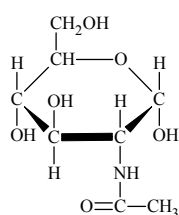
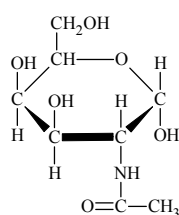
	Amilose	**Amilopectina**	**Glicogênio**
Unidades monoméricas	D-glicose	D-glicose	D-glicose
Peso molecular	4.000 → 500.000	50.000 → 16 x 10^6	50.000 → *n* x 10^6
Tipo de polímero	Linear	Ramificado	Ramificado
Pontos de ramificação	–	24–30 resíduos de glicose	8–12 resíduos de glicose
Ligações glicosídicas	α(1→4)	α(1→4), α(1→6)	α(1→4), α(1→6)

3. Celulose. É uma seqüência linear de unidades de D–glicose unidas por ligações glicosídicas β(1→4). É o principal componente das paredes celulares nos vegetais e um dos compostos orgânicos mais abundantes na biosfera. A hidrólise parcial da celulose produz o dissacarídio redutor *celobiose:*

Celulose

Os vertebrados não têm *celulases* e, portanto, não podem hidrolisar as ligações β(1→4) da celulose presentes na madeira e fibras vegetais. Entretanto, alguns herbívoros contêm microrganismos produtores de celulases, razão pela qual podem digerir celulose.

4. Quitina. É o principal componente estrutural do exoesqueleto de invertebrados como insetos e crustáceos. A quitina é constituída de resíduos de *N*–acetilglicosamina em ligações β(1→4) e forma longas cadeias retas que exerce papel estrutural. Se diferencia quimicamente da celulose quanto ao substituinte em C2, que é um grupamento amina acetilado em lugar de uma hidroxila.

B. Heteropolissacarídeos

São polímeros de carboidratos formados por mais de um tipo de carboidratos. Os principais exemplos são os glicosaminoglicanos e os peptídeoglicanos.

1. Glicosaminoglicanos (GAG). São polissacarídeos lineares constituídos por resíduos repetitivos de dissacarídeos de *ácido urônico* (geralmente o ácido D−glicurônico ou o ácido L−idurônico) e de *N−acetilglicosamina* ou *N−acetilgalactosamina*. Em alguns glicosaminoglicanos uma ou mais das hidroxilas do açúcar aminado estão esterificadas com sulfatos. Os grupos carboxilato e os grupos sulfato contribuem para a alta densidade de cargas negativas dos glicosaminoglicanos. Tanto a carga elétrica como a estrutura macromolecular, colabora para o seu papel biológico de lubrificar e manter tecido conjuntivo. Esses compostos formam soluções de alta viscosidade e elasticidade pela absorção de grandes quantidades de água. Atuam assim, na estabilização e suporte dos elementos fibrosos e celulares dos tecidos, também como contribuem na manutenção do equilíbrio da água e sal do organismo.

N−Acetil−D−glicosamina *N*−Acetil−D−galactosamina

Na síntese dos glicosaminoglicanos, os grupos sulfato são introduzidos em posições específicas da cadeia polissacarídica por um doador de sulfato ativo, o *3´−fosfoadenosilfosfosulfato* (PAPS) em reação catalisada por *sulfotransferases*.

Os glicosaminoglicanos estão presentes nos espaços extracelulares como uma matriz gelatinosa que embebem o colágeno e outras proteínas, particularmente nos tecidos conjuntivos (cartilagens, tendões, pele, parede de vasos sangüíneos). O glicosaminoglicano

heparina não está presente no tecido conjuntivo, mas ocorre como grânulos nas células das paredes arteriais e tem função anticoagulante – inibe a coagulação evitando a formação de coágulos.

Tabela 5.2 – Estrutura dos principais dissacarídeos repetidos de alguns glicosaminoglicanos da matriz extracelular

Glicosaminoglicanos	Principais dissacarídeos repetidos			Ligação glicosídica
	Componente 1	Ligação glicosídica	Componente 2	
Hialuronato	D−Glicuronato	β(1→3)	*N*−Acetilglicosamina	β(1→4)
Condroitina sulfato	D−Glicuronato	β(1→3)	*N*−Acetilgalactosamina	β(1→4)
Dermatana sulfato	L−Iduronato	α(1→3)	*N*−Acetilgalactosamina	β(1→4)
Queratona sulfato	D−Galactose	β(1→4)	*N*−Acetilglicosamina	β(1→3)

Várias enfermidades genéticas denominadas mucopolissacaridoses são causadas por defeitos no metabolismo dos glicosaminoglicanos. As desordens são caracterizadas pelo acúmulo nos tecidos e a excreção na urina de produtos oligossacarídicos derivados do seu desdobramento incompleto, devido a deficiência de uma ou mais hidrolases lisossomais (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Enfermidades genéticas envolvendo o metabolismo dos glicosaminoglicanos (mucopolissacaridoses).

Síndrome e sinais clínicos	Enzima deficiente	Produtos acumulados
Hurler: defeitos ósseos, retardamento mental, embaçamento da córnea, morte prematura	α−L−Iduronidase	Dermatana sulfato Heparana sulfato
Scheie: embaçamento da córnea, articulações rígidas	α−L−Iduronidase	Dermatana sulfato Heparana sulfato
Hunter: semelhante aos de Hurler sem efeitos sobre a córnea	Iduronatosulfatase	Heparana sulfato Dermatana sulfato
Sanfilippo A: grave retardamento mental	Heparan sulfatase	Heparana sulfato
Sanfilippo B: defeitos ósseos, retardamento psicomotor	N−Acetilglicosaminidase	Heparana sulfato
Maroteaux-Lamy: graves defeitos esqueléticos	N−Acetilgalactosamina sulfatase	Dermatana sulfato
Morquio: defeitos graves dos ossos, da córnea	Galactosamina−sulfatase	Queratana sulfato Condroitina sulfato
Sly: retardamento mental	β−D−Glicuronidase	Dermatana sulfato Heparana sulfato
DiFerrante: retardamento mental	Glicosamina−6−sulfato sulfatase	Queratan sulfato Heparana sulfato

2. Peptideoglicanos (mureínas). As paredes celulares de muitas bactérias são formadas por *peptídeosglicanos,* que são cadeias de

heteroglicanos ligados a peptídeos. São macromoléculas que consistem de cadeias polissacarídicas e polipeptídicas unidas por ligações cruzadas covalentes e são componentes da parede celular de bactérias. A virulência e os antígenos característicos das bactérias são propriedades do revestimento das suas paredes celulares. As bactérias são classificadas de acordo com a coloração ou não pelo corante de Gram:

- *Bactérias gram−positivas,* ex.: *Staphylococcus aureus,* possuem parede celular espessa (~25 nm) formada por várias camadas de peptídeoglicanos que envolvem a sua membrana plasmática.

- *Bactérias gram−negativas,* ex.: *Escherichia coli,* possuem uma parede celular fina (~2−3 nm) consistindo de uma única camada de peptídeoglicano inserida entre membranas lipídicas interna e externa. Essa estrutura é responsável pela maior resistência das bactérias gram-negativas aos antibióticos.

A estrutura polimérica dos peptídeosglicanos é composta de cadeias lineares *N−acetil−D−glicosamina* (GlcNAc) e de *ácido N−acetilmurâmico* (MurNAc) alternadas, unidos por ligações $\beta(1\rightarrow4)$. Cadeias dessas estruturas são covalentemente cruzadas pelas cadeias laterais de seus tetrapeptídeos constituídas alternativamente por resíduos de D− e L−aminoácidos.

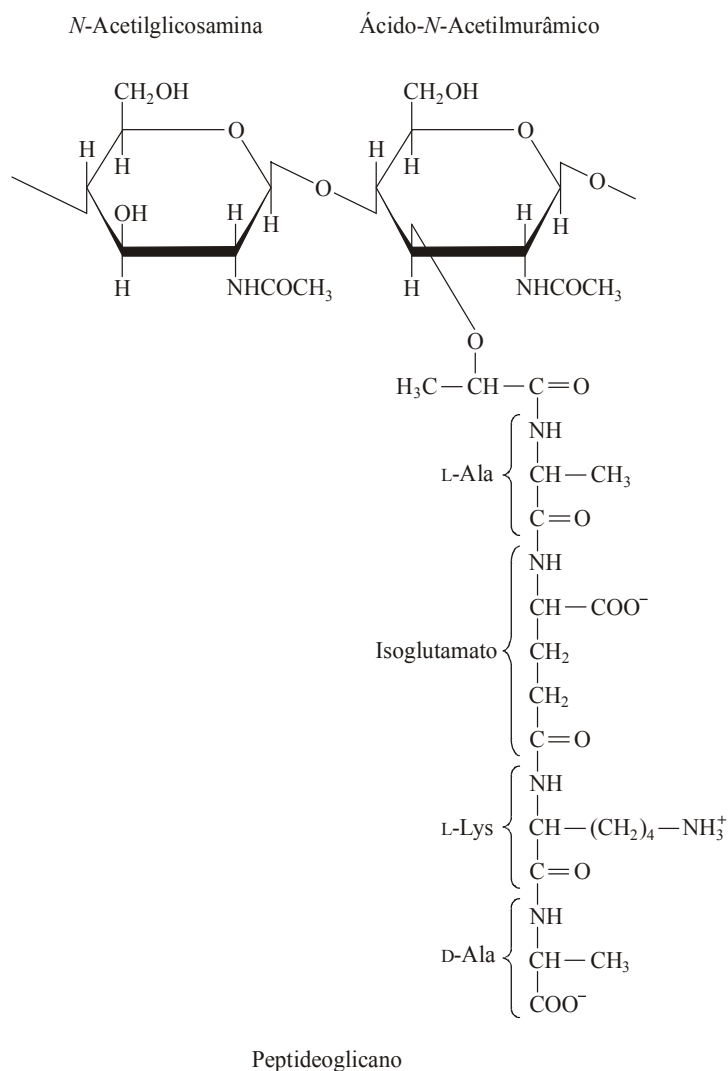
N-Acetilglicosamina Ácido-*N*-Acetilmurâmico

L-Ala

Isoglutamato

L-Lys

D-Ala

Peptideoglicano

5.4 Glicoconjugados

Os compostos que resultam da ligação covalente de moléculas de carboidratos às proteínas e aos lipídeos são coletivamente denominados *glicoconjugados*. Exercem efeitos profundos nas funções celulares e também como mediadores para interações específicas célula-célula de organismos multicelulares. Há duas classes de conjugados carboidratos-proteínas: as *glicoproteínas* e os *proteoglicanos*.

A. Glicoproteínas

As glicoproteínas são proteínas conjugadas que possuem como grupos prostéticos um ou vários oligosacarídeos formando uma série de unidades repetidas e ligadas covalentemente a uma proteína. Essa definição exclui os proteoglicanos que serão descritos posteriormente.

A ligação covalente entre os açúcares e a cadeia peptídica é a parte central da estrutura das glicoproteínas. As principais são: (1) *ligações N–glicosídicas* entre a *N*–acetilglicosamina (GlcNAc) e o aminoácido asparagina (Asn), (2) *ligações O–glicosídicas* entre a *N*–acetilgalactosamina (GalNAc) e o grupo OH da serina (Ser) ou treonina (Thr).

As glicoproteínas são moléculas constituintes da maioria dos organismos vivos. Ocorrem nas células na forma solúvel ou ligada às membranas, e nos líquidos extracelulares. Os vertebrados são particularmente ricos em glicoproteínas. Exemplos dessas substâncias incluem a proteína transferrina (transportadora de ferro), a ceruloplasmina (transportadora de cobre), fatores da coagulação sangüínea e muitos componentes do complemento (proteínas envolvidas em reações do sistema imune). Vários hormônios são glicoproteínas, por exemplo, o hormônio folículo estimulante (FSH), produzido pela hipófise anterior que estimula o desenvolvimento dos ovários na mulher e a espermatogênese no homem. Além disso, muitas enzimas são glicoproteínas. A ribonuclease (RNase), a enzima que degrada o ácido ribonucléico, é um exemplo bem estudado. Outras glicoproteínas são proteínas integrais de membrana. Entre elas, a *(Na^+–K^+)–ATPase* (proteína que bombeia Na^+ para fora e K^+ para dentro da célula) e o *complexo de histocompatibilidade principal* (MHC) (marcador da superfície celular externa que reconhece os antígenos protéicos dos hospedeiros) são exemplos especialmente interessantes..

As moléculas de proteínas são protegidas da desnaturação em presença de glicoproteínas. Por exemplo, a RNase A bovina é mais susceptível a desnaturação pelo calor que sua contrapartida glicosilada, a RNase B. Vários estudos têm demonstrado que as glicoproteínas ricas em açúcares são relativamente resistentes à proteólise (quebra de polipeptídeos por reações hidrolíticas catalisadas por enzimas). Como o carboidrato está sobre a superfície da molécula, pode formar uma cápsula envolvendo a cadeia polipeptídica das enzimas proteolíticas.

Os carboidratos nas glicoproteínas parecem afetar a função biológica. Em algumas glicoproteínas, essa função é mais facilmente discernida que em outras. Por exemplo, o elevado conteúdo de resíduos de ácido siálico é responsável pela alta viscosidade das mucinas salivares (as glicoproteínas lubrificantes da saliva). Outro exemplo é são as glicoproteínas anticongelamento dos peixes da Antártica. Aparentemente, os resíduos dissacarídicos formam pontes de hidrogênio com as moléculas de água. O processo retarda a formação de cristais de gelo.

As glicoproteínas também são importantes como mediadores para os eventos célula-molécula, célula-vírus e célula-célula. Um dos exemplos do envolvimento glicoprotéico nas interações célula-molécula incluem o receptor de insulina, o qual liga a insulina para facilitar o transporte de glicose para o interior de numerosas células. Em parte, isso é realizado pelo recrutamento de transportadores de glicose para a membrana plasmática. Além disso, o transportador de glicose que atua no deslocamento da glicose para dentro da célula também é uma glicoproteína. A interação entre gp120, a glicoproteína ligadora na célula-alvo do vírus da imunodeficiência humana (HIV, o agente causador da AIDS) e as células hospedeiras é um exemplo da interação célula–vírus. O acoplamento do gp120 ao receptor CD4

(glicoproteína transmembrana) encontrado na superfície de vários células hospedeiras é considerada a primeira etapa no processo infeccioso.

As glicoproteínas estruturais da célula, componentes do *glicocálix,* exercem papel fundamental na adesão celular. O processo é um evento crítico nas interações do crescimento e diferenciação célula-célula. As substâncias denominadas *moléculas de adesão celular* (CAMs) estão envolvidas no desenvolvimento embrionário do sistema nervoso do rato. Os resíduos de ácido siálico nos oligossacarídeos *N*–ligados de várias CAMs são importantes nesse fenômeno.

Atualmente, o conteúdo de carboidratos nas glicoproteínas está sendo empregado na investigação de processos normais como o desenvolvimento de nervos e de certos processos patológicos. Por exemplo, as variações nos conteúdos de galactose nos anticorpos IgG estão diretamente relacionadas com a severidade (o grau de inflamação) da artrite juvenil. Além disso, a distribuição dos carboidratos de superfície em células cancerosas pode contribuir no processo diagnóstico de tumores e metástases.

B. Proteoglicanos

Os *proteoglicanos* são macromoléculas presentes na matriz extracelular, constituídas pala união covalente e não-covalente de proteínas e glicosaminoglicanos (GAG). As cadeias GAG estão ligadas às proteínas por ligações *N*– e *O*–glicosídicas. São substâncias polianiônicas formadas por cadeias de unidades diolosídicas repetidas como a *queratona–sulfato* e o *condroitina–sulfato* que estão covalentemente ligadas ao esqueleto polipeptídico chamado *proteína central.* Essas proteínas estão ligadas não-covalentemente a um longo filamento de *ácido hialurônico*. A cartilagem, que é formada por uma rede de fibrilas de colágeno preenchida por proteoglicanos, pode amortecer forças compressivas porque esses polianíons são altamente hidratados e expulsam a água durante a compressão. Quando a cessa a pressão, a água retorna aos proteoglicanos que voltam a ter a estrutura inicial.

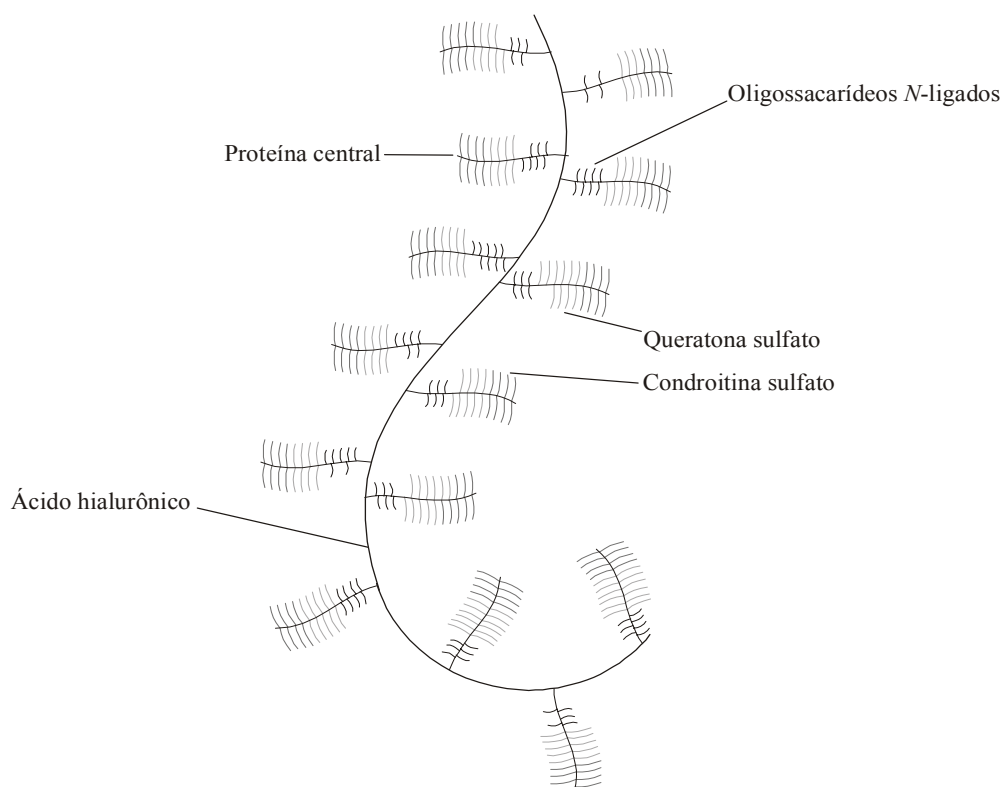



Figura 5.5
Estrutura do proteoglicano. Existem várias proteínas centrais ligadas de modo não-covalente ao filamento central de ácido hialurônico.

Resumo

1. Os carboidratos, as moléculas mais abundantes na natureza, são classificados como monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos de acordo com o número de unidades de açúcar que contêm. Os carboidratos também ocorrem como componentes de outras biomoléculas. Glicoconjugados são moléculas de proteínas e lipídeos covalentemente ligados a grupos carboidratos. Incluem proteoglicanos, glicoproteínas e glicolipídeos.

2. Os monossacarídeos com grupos funcionais aldeído são aldoses; aqueles com grupos cetona são cetoses. Açúcares simples pertencem à família D e L, de acordo com a configuração do carbono assimétrico mais distante dos grupos funcionais aldeído e cetona semelhantes ao D e L isômero do gliceraldeído. A família D contém os açúcares biologicamente mais importantes.

3. Açúcares que contêm cinco ou seis carbonos existem nas formas cíclicas que resultam da reação entre grupos hidroxila e aldeído (produto hemiacetal) ou grupos cetonas (produto hemicetal). Tanto nos anéis com cinco membros (furanoses) como os anéis com seis membros (piranoses), o grupo hidroxila ligado ao carbono anomérico está abaixo (α) ou acima (β) do plano do anel. A interconversão espontânea entre as formas α e β é chamada mutarrotação.

4. Os açúcares simples sofrem vários tipos de rações químicas. Derivados dessas moléculas, como os ácidos urônicos, aminoaçúcares,

desoxiaçúcares e açúcares fosforilados, exercem importantes papéis no metabolismo celular.

5. Hemiacetais e hemicetais reagem com álcoois para formar acetais e cetais, respectivamente. Quando a forma cíclica hemiacetal ou hemicetal de um monossacarídeo reage com um álcool, a nova ligação é denominada ligação glicosídica, e o composto é chamado glicosídeo.

6. As ligações glicosídicas são formadas entre o carbono anomérico de um monossacarídeo e um dos grupos hidroxila livre de outro monossacarídeo. Dissacarídeos são carboidratos compostos de dois monossacarídeos. Os oligossacarídeos, carboidratos que contêm até 10 unidades de monossacarídeos, estão muitas vezes ligados a proteínas e lipídeos. As moléculas de polissacarídeos são compostas de grande número de unidades de monossacarídeos, tem estrutura linear como a celulose e amilose ou estrutura ramificada como o glicogênio e amilopectina. Os polissacarídeos podem ser formados por um único tipo de açúcar (homopolissacarídeos) ou tipos múltiplos (heteropolissacarídeos).

7. Os três homopolissacarídeos mais comuns encontrados na natureza (amido, glicogênio e celulose) fornecem D-glicose quando são hidrolizados. A celulose é um material estrutural das plantas; amido e glicogênio são formas de armazenamento de glicose nos vegetais e células animais, respectivamente. A quitina, o principal composto estrutural dos exoesqueletos dos insetos, é composta de resíduos de N−acetil−glicosamina ligados a carbonos não-ramificados. Os glicosaminoglicanos, os principais componentes dos proteoglicanos, e mureína, um constituinte fundamental das paredes das células bacterianas, são exemplos de heteropolissacarídeos, polímeros de carboidratos que contêm mais de um tipo de monossacarídeo.

8. A enorme heterogeneidade dos proteoglicanos, que são encontrados predominantemente na matriz extracelular dos tecidos, exercem diversos, mas ainda não totalmente entendidos, papéis nos organismos vivos. As glicoproteínas ocorrem nas células, tanto na forma solúvel como na forma ligada à membrana, e em líquidos extracelulares. Devido a sua estrutura diversificada, os glicoconjugados, que incluem os proteoglicanos, glicoproteínas e glicolipídeos, exercem importantes funções na transferência de informações nos seres vivos.

Referências

BLACKSTOCK, J. C, **Biochemistry.** Oxford: Butterworth, 1998. p. 106-22.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger: Princípios de bioquímica.** 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 409-40.

STRYER, L. **Bioquímica.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. p. 437-556.

McKEE, T., McKEE, J.R. **Biochemistry:** The molecular basis of live. 3 ed. New York: McGraw-Hill, 2003. p. 200-33.

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica.** Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 195-218.

6

Metabolismo dos Carboidratos

Objetivos

1. Descrever a digestão e absorção dos carboidratos
2. Descrever a seqüência as reações da glicólise, incluindo seus substratos, produtos e co-fatores.
3. Calcular o balanço energético da transformação de 1 mol de glicose em 2 mol de lactato (glicólise anaeróbica).
4. Explicar como a relação [ATP]/[ADP] pode controlar a velocidade da glicólise.
5. Descrever a formação do glicogênio (glicogênese)
6. Descrever a degradação do glicogênio (glicogenólise).
7. Reconhecer a ação da adrenalina e do glucagon no metabolismo do glicogênio.
8. Descrever o papel fisiológico do efeito controle do AMPc sobre o metabolismo dos carboidratos.
9. Descrever a gliconeogênese a partir do lactato, alanina e glicerol.
10. Descrever a via pentose-fosfato.
11. Explicar como a galactose, a frutose e a manose são utilizadas para a produção de energia.

Os carboidratos, as biomoléculas mais abundantes na natureza, são as fontes universais de nutrientes para as células humanas. A glicose é o carboidrato mais importante. Nas células, a glicose é degradada ou armazenada por diferentes vias. A *glicólise* transforma a glicose em duas moléculas de piruvato (ou lactato) posteriormente, degradado para a produção de energia. O glicogênio, a forma de armazenamento da glicose nos mamíferos, é sintetizado pela *glicogênese.* As reações da *glicogenólise* desdobram o glicogênio em glicose. É também possível sintetizar glicose a partir de precursores não–carboidratos pelo mecanismo chamado *gliconeogênese.* A *via das pentoses–fosfato* converte a glicose em ribose−5−fosfato (o açúcar utilizado para a síntese dos nucleotídeos e ácidos nucléicos) e outros tipos de monossacarídeos. O NADPH, um importante agente redutor celular, é também produzido por essa via.

A síntese e o uso da glicose, o principal combustível da maioria dos organismos, é o foco de discussão do metabolismo dos

Intolerância à lactose

Alguns grupos populacionais apresentam carência de *lactase* na idade adulta. A deficiência dessa enzima impede a hidrólise da lactose que se acumula no lúmem intestinal. A grande pressão osmótica exercida pela lactose não-absorvida promove um influxo de água para o intestino. A lactose degradada pela ação bacteriana, forma vários ácidos com a liberação de dióxido de carbono. A combinação desses efeitos provoca distensão abdominal, cólicas, náusea e diarréia. Essa condição é conhecida como *intolerância `a lactose*.

carboidratos. Nos vertebrados, a glicose é transportada através do corpo pelo sangue. Quando as reservas de energia celular estão baixas, a glicose é degradada pela via glicolítica. As moléculas de glicose não necessárias para a imediata produção de energia, são armazenadas como glicogênio no fígado e músculo. Dependendo das necessidades metabólicas da célula, a glicose pode também ser empregada para sintetizar outros monossacarídeos, ácidos graxos e certos aminoácidos.

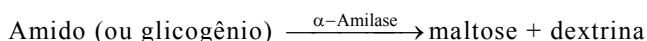
6.1 Digestão e absorção dos carboidratos

Os principais carboidratos da dieta são: o amido, a sacarose e a lactose. O glicogênio, a maltose, a glicose livre e a frutose livre constituem frações relativamente menores de carboidratos ingeridos.

A absorção dos carboidratos pelas células do intestino delgado é realizada após hidrólise dos dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos em seus componentes monossacarídeos. As quebras ocorrem seqüencialmente em diferentes segmentos do trato gastrointestinal por reações enzimáticas:

1. α-Amilase salivar. A digestão do amido inicia durante a mastigação pela ação *α-amilase salivar* (ptialina) que hidrolisa as ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, com a liberação de maltose e oligossacarídeos. Contudo, a α-amilase salivar não contribui significativamente para a hidrólise dos polissacarídeos, devido ao breve contato entre a enzima e o substrato. Ao atingir o estômago, a enzima é inativada pelo baixo pH gástrico.

2. α-Amilase pancreática. O amido e o glicogênio são hidrolisados no duodeno em presença da *α-amilase pancreática* que produz maltose como produto principal e oligossacarídeos chamados dextrinas – contendo em média oito unidades de glicose com uma ou mais ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$. Certa quantidade de isomaltose (dissacarídeo) também é formada.

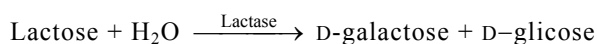
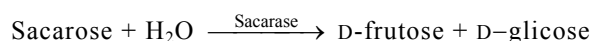
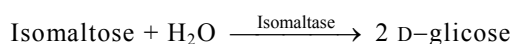
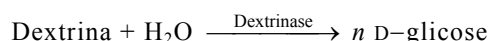
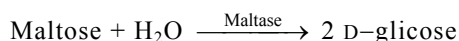
$$\text{Amido (ou glicogênio)} \xrightarrow{\alpha\text{-Amilase}} \text{maltose + dextrina}$$

3. Enzimas da superfície intestinal. A hidrólise final da maltose e dextrina é realizada pela *maltase* e a *dextrinase,* presentes na superfície das células epiteliais do intestino delgado. Outras enzimas também atuam na superfície das células intestinais: a *isomaltase,* que hidrolisa as ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ da isomaltose, a *sacarase,* que hidrolisa as ligações $\alpha,\beta(1\rightarrow2)$ da sacarose em glicose e frutose, a *lactase* que fornece glicose e galactose pela hidrolise das ligações $\beta(1\rightarrow4)$ da lactose.

$$\text{Maltose} + H_2O \xrightarrow{\text{Maltase}} 2\ \text{D-glicose}$$

$$\text{Dextrina} + H_2O \xrightarrow{\text{Dextrinase}} n\ \text{D-glicose}$$

$$\text{Isomaltose} + H_2O \xrightarrow{\text{Isomaltase}} 2\ \text{D-glicose}$$

$$\text{Sacarose} + H_2O \xrightarrow{\text{Sacarase}} \text{D-frutose} + \text{D-glicose}$$

$$\text{Lactose} + H_2O \xrightarrow{\text{Lactase}} \text{D-galactose} + \text{D-glicose}$$

Quadro 6.1 Diabete melito

O diabete melito (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas.

Pacientes portadores de episódios hiperglicêmicos, quando não tratados, desenvolvem cetoacidose ou coma hiperosmolar. Com o progresso da doença aumenta o risco de desenvolver complicações crônicas, tais como: retinopatia, angiopatia, doença renal, neuropatia, proteinúria, infecção, hiperlipemia e doença aterosclerótica.

Diabetes melito tipo 1 (imuno-mediado). Resulta primariamente da destruição das células β pancreáticas e tem tendência a cetoacidose. Inclui casos decorrentes de doença auto-imune e aqueles nos quais a causa da destruição das células β não é conhecida. O tipo 1 compreende 5-10% de todos os casos de diabetes melito. Pacientes com DM tipo 1 acredita-se ter susceptibilidade genética no desenvolvimento do diabetes. A exposição a um desencadeador (viral, ambiental, toxina) estimula a destruição imunologicamente mediada das células β. A hiperglicemia está presente quando 80-90% das células β estão destruídas.

Diabetes melito tipo 2. Resulta, em geral, de graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina. A maioria dos pacientes tem excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais, como durante infecções graves. Ao redor de 80-90% de todos os casos de diabetes correspondem a esse tipo. Ocorre, em geral, em indivíduos obesos com mais de 40 anos, de forma lenta e com história familiar de diabetes. Os pacientes apresentam sintomas moderados e *não* são dependentes de insulina para prevenir cetonúria. Nesses casos os níveis de insulina podem ser: normais, diminuídos ou aumentados.

A captação de monossacarídeos do lúmen para a célula intestinal é efetuada por dois mecanismos:

- *Transporte passivo (difusão facilitada).* O movimento da glicose está "a favor" do gradiente de concentração (de um compartimento de maior concentração de glicose para um compartimento de menor concentração). A difusão facilitada é mediada por um *sistema de transporte de monossacarídeos* do tipo *Na^+–independente*. O mecanismo tem alta especificidade para D–frutose.
- *Transporte ativo.* A glicose é captada do lúmen para a célula epitelial do intestino por um *co–transportador Na^+–monossacarídeo* (SGLT). É um processo ativo indireto cujo mecanismo é envolve a *(Na^+–K^+)–ATPase* (bomba de (Na^+–K^+), que remove o Na^+ da célula, em troca de K^+, com a hidrólise concomitante de ATP (*ver* Capítulo 9: seção 9.4.D). O mecanismo tem alta especificidade por D–glicose e D–galactose.

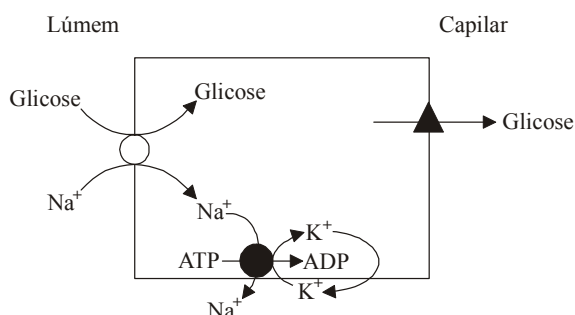



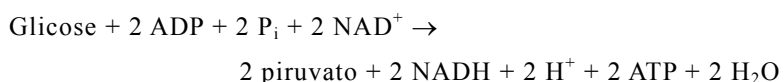
Figura 6.1
Captação da glicose por transporte ativo

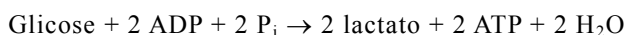
Após a absorção, a glicose no sangue aumenta e as células β das ilhotas pancreáticas secretam insulina que estimula a captação de glicose principalmente pelos tecidos adiposo e muscular. O fígado, o cérebro e os eritrócitos, não necessitam de insulina para captação de glicose por suas células (tecidos insulino–independentes). Outros hormônios e enzimas, além de vários mecanismos de controle, são importantes na regulação da glicemia.

6.2 Glicólise

A glicólise (do grego, *glykos,* doce e *lysis,* romper), também chamada via de Embden–Meyerhof–Parnas, é a via central do catabolismo da glicose em uma seqüência de dez reações enzimáticas que ocorrem no citosol de todas as células humanas. Cada molécula de glicose é convertida em duas moléculas de piruvato, cada uma com três átomos de carbonos em processo no qual vários átomos de carbono são oxidados. Parte da energia livre liberada da glicose é conservada na forma de ATP e de NADH. Compreende dois estágios:

- *Primeiro estágio* (fase preparatória). Compreendem cinco reações nas quais a glicose é fosforilada por dois ATP e convertida em duas moléculas de *gliceraldeído–3–fosfato.*
- *Segundo estágio* (fase de pagamento). As duas moléculas de gliceraldeído–3–fosfato são oxidadas pelo NAD^+ e fosforiladas em reação que emprega o fosfato inorgânico. O resultado líquido do processo total de glicólise é a formação de 2 ATP, 2 NADH e 2 piruvato, às custas de uma molécula de glicose. A equação geral da glicólise é:

$$\text{Glicose} + 2\ \text{ADP} + 2\ P_i + 2\ NAD^+ \rightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\ \text{NADH} + 2\ H^+ + 2\ \text{ATP} + 2\ H_2O$$

Em condições de baixo suprimento de oxigênio (hipóxia) ou em células sem mitocôndrias, o produto final da glicólise é o *lactato* e não o piruvato, em processo denominado *glicólise anaeróbica:*

$$\text{Glicose} + 2\ \text{ADP} + 2\ P_i \rightarrow 2\ \text{lactato} + 2\ \text{ATP} + 2\ H_2O$$

Quando o suprimento de oxigênio é adequado, o piruvato é transformado em acetil–CoA nas mitocôndrias. O grupo acetil da acetil–CoA é totalmente oxidado no ciclo do ácido cítrico com a formação de duas moléculas de CO_2 (*ver* Capítulo 7).

A. Reações da glicólise

Todas as reações da glicólise com formação de piruvato (ou lactato) são catalisadas por enzimas presentes no citoplasma (Figura 6.2). Para cada molécula de glicose são consumidas duas moléculas de ATP no primeiro estágio e no segundo estágio são produzidas quatro ATP e 2 NADH. Os elétrons oriundos da reoxidação do NADH em NAD^+ em condições aeróbicas, são transferidos para o oxigênio molecular na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons que

libera a energia livre para a síntese de ATP pela *fosforilação oxidativa* (*ver* Capítulo 8).

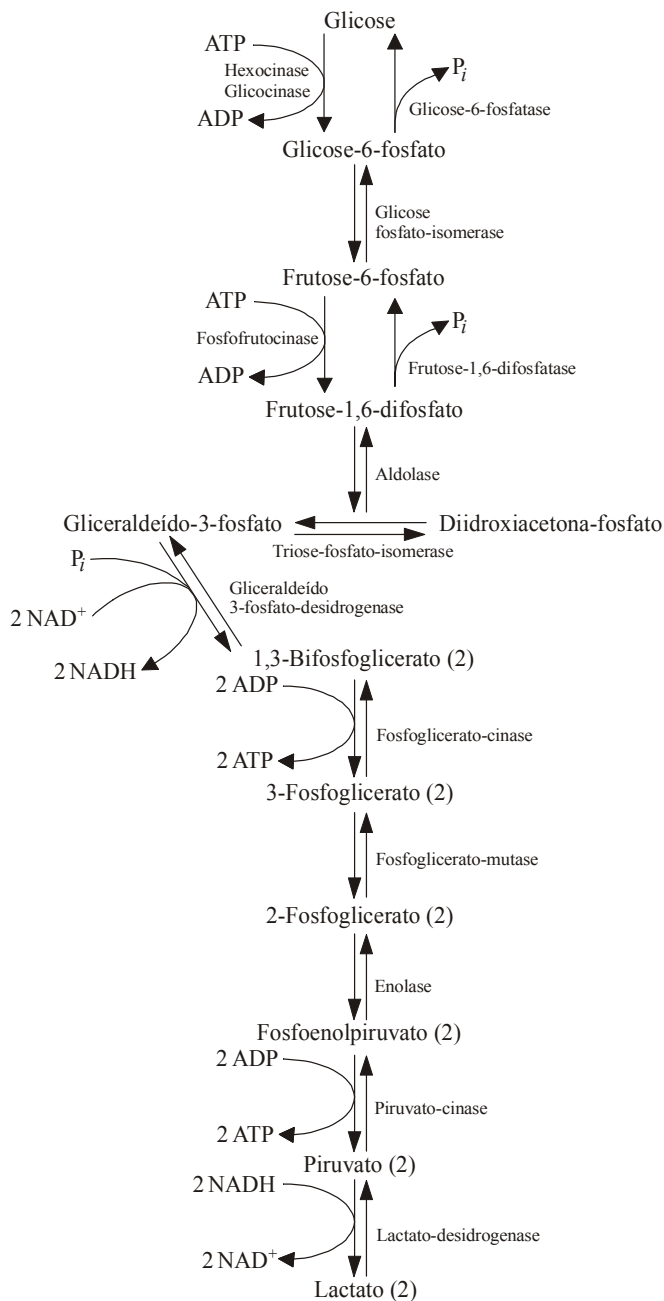



Figura 6.2
Reações da glicólise.

1. Síntese de glicose–6–fosfato (G6P). Na primeira reação da glicólise, a glicose é ativada por fosforilação no grupo hidroxila em

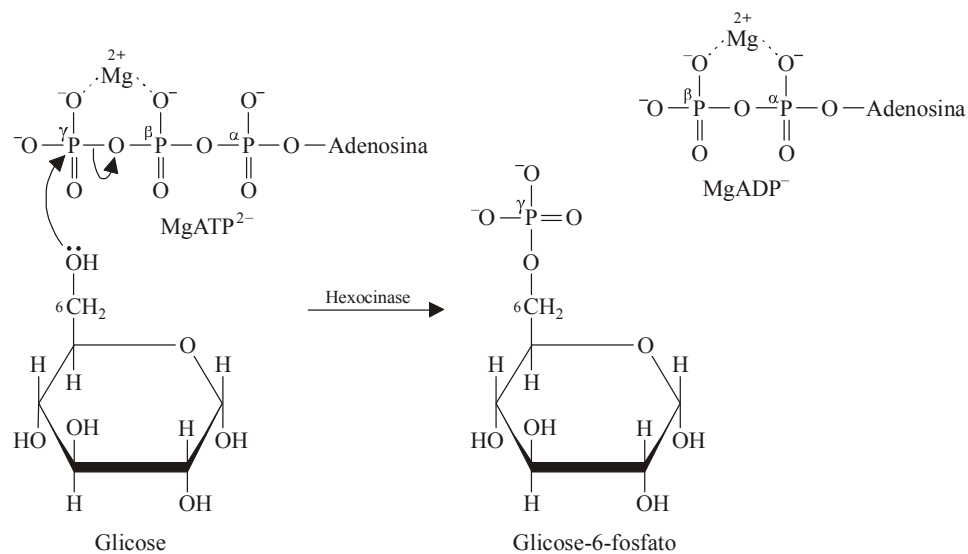
C6 com a formação de glicose−6−fosfato pela transferência de um grupo fosfato do ATP em reação irreversível catalisada pela *hexocinase* em presença de íons magnésio que interage com as cargas negativas dos grupos fosfato para formar o complexo $MgATP^{2-}$. A hexocinase é inibida alostericamente pelo produto da reação, a glicose−6−fosfato.

Hexocinase

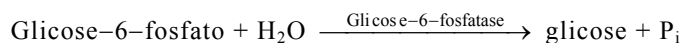
Glicose

Glicose-6-fosfato

$MgATP^{2-}$

$MgADP^{-}$

A glicose é eletricamente neutra, mas quando fosforilada, torna-se um composto carregado negativamente e hidrofílico, que impede a sua transferência através da membrana celular, confinado-a na célula. A hexocinase também catalisa a fosforilação de outras hexoses (Quadro 6.2)

A glicose livre é obtida a partir da hidrólise da glicose-6-fosfato pela enzima *glicose−6−fosfatase* e pode ser transportada pelo sangue para os órgãos periféricos:

$$\text{Glicose−6−fosfato} + H_2O \xrightarrow{\text{Glicose−6−fosfatase}} \text{glicose} + P_i$$

A glicose livre formada nessa hidrólise é de grande importância para a manutenção dos níveis de glicemia pelo fígado, na última etapa da gliconeogênese e da glicogenólise. A reação não regenera o ATP.

Quadro 6.2 Hexocinase e glicocinase

A enzima *hexocinase* cataliza a fosforilação de diferentes monossacarídios de seis carbonos, como a D-glicose, D manose, D-frutose e D-glicosamina.

Diferentes isoenzimas (proteínas que catalisam a mesma reação) da hexocinase estão presentes em vários tecidos de mamíferos. Cada isoenzima exibe propriedades cinéticas diferentes. As células hepáticas (hepatócitos) de mamíferos também contém *glicocinase* (também chamada *hexocinase tipo IV*) que difere das isoenzimas do músculo esquelético. A ação catalítica da glicocinase está restrita a D-glicose e a D-manose e tem um *K*m de ~10mM para a glicose. Essa enzima requer, portanto, níveis bem mais elevados de glicose para a sua atividade máxima (o *K*m das outras isoenzimas é ~0,1 mM). A glicocinase não é inibida pela glicose-6-fosfato, mas pelo seu isômero, a frutose-6-fosfato e é mediada por uma *proteína reguladora.*

Em alguns microorganismos e invertebrados, existe uma *glicocinase* diferente formado por um grupo de isoenzimas específicas para glicose. Nesses organismos, a glicocinase catalisa a reação inicial da glicólise.

A glicose é eletricamente neutra, mas quando fosforilada, apresenta uma carga negativa que impede a sua transferência através da membrana celular, confinado-a na célula. A hexocinase também catalisa a fosforilação de outras hexoses (*ver* Quadro lateral

As células do fígado contêm *glicocinase* (ou hexocinase IV) que também catalisa a fosforilação da glicose a glicose–6–fosfato. Essa enzima não é inibida pelos teores elevados da glicose–6–fosfato e atua quando a concentração de glicose sangüínea estiver acima dos teores fisiológicos normais, como, por exemplo, após uma refeição rica em carboidratos. Desse modo, o fígado atua como um "tampão" de glicose sangüínea, pois capta o excesso de glicose circulante independente da concentração de glicose–6–fosfato, tornando possível o armazenamento de glicose sob a forma de glicogênio ou ácidos graxos. A glicocinase é ativada pela insulina e, assim, sua atividade é deficiente nos estados de desnutrição e no diabete melito.

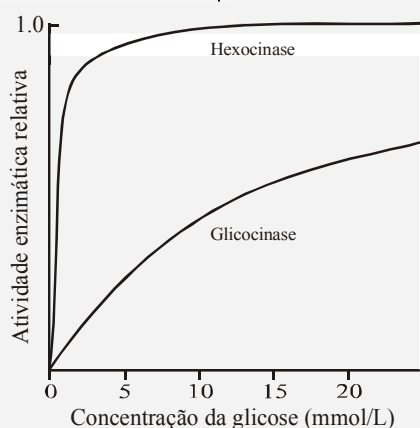



Figura 6.3
Diferenças na velocidade de fosforilação das enzimas hexocinase e glicocinase em relação à concentração de glicose.

Quadro 6.3 Destino da glicose–6–fosfato

A glicose-6-fosfato é um importante intermediário central para várias rotas metabólicas.

A via alternativa predominante depende do estado metabólico do organismo e varia em diferentes condições.

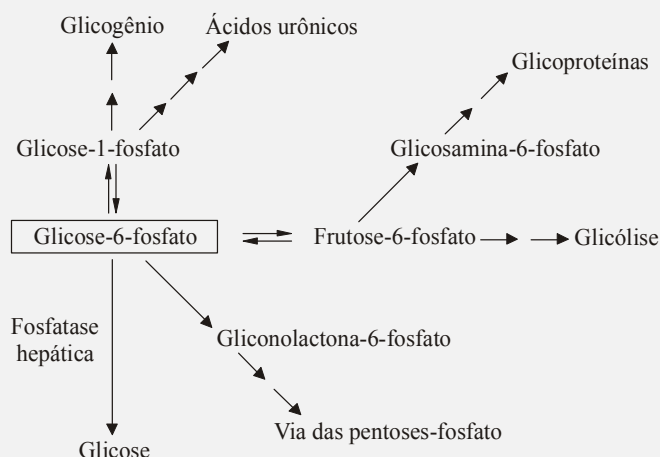
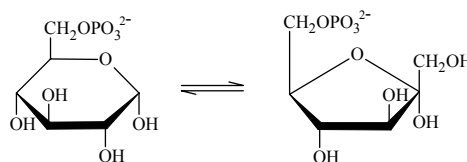
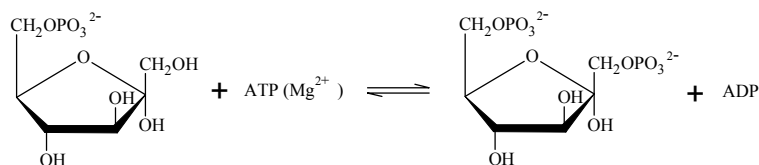



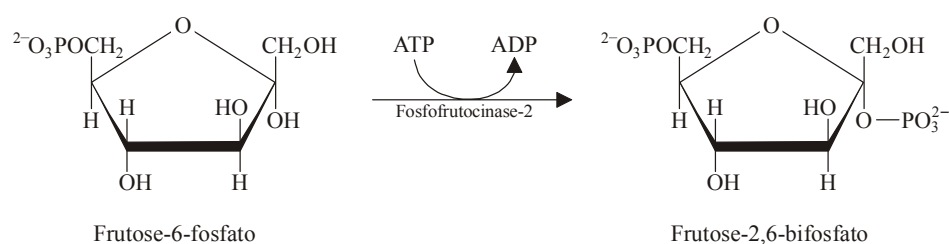
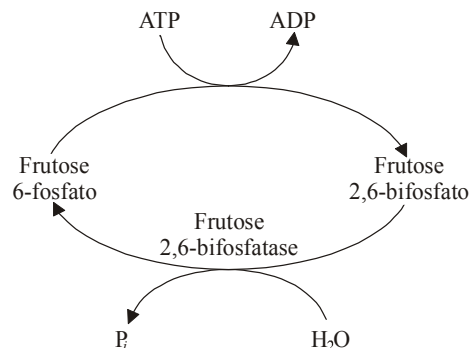
Figura 6.4
Destinos da glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato pode ser usada como: (1) combustível pelo metabolismo anaeróbico ou aeróbico, por exemplo, no músculo; (2) ser convertida em glicose livre no fígado e, subsequentemente, liberada para o sangue; (3) ser processada pela via das pentoses-fosfato para gerar NADH ou ribose em vários tecidos; (4) formar compostos de grande importância metabólica.

2. Conversão da glicose-6-fosfato em frutose–6–fosfato (F6P). A isomerização reversível da glicose–6–fosfato em frutose–6–fosfato é catalisada pela *fosfoglicose–isomerase.* A aldose (glicose–6–fosfato) é convertida em cetose (frutose–6–fosfato). O oxigênio carbonílico se deslocou do C1 para o C2:

3. Fosforilação da frutose–6–fosfato em frutose–1,6–bifosfato (FBP). A *fosfofrutocinase–1* (PFK–1) catalisa irreversivelmente a transferência do grupo fosfato do ATP para o C1 da frutose–6–fosfato com a formação de frutose–1,6–bifosfato:

A fosfofrutocinase–1 é a principal enzima reguladora da glicólise nos músculos. A atividade da enzima é modulada em presença de ativadores ou inibidores alostéricos (Quadro 6.1).

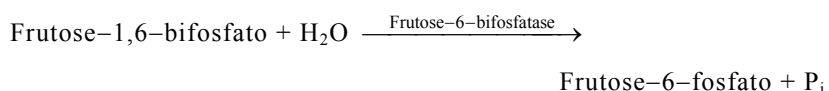
Quadro 6.1 – Principais efetores alostéricos da fosfofrutocinase-1.

Efetores positivos (ativadores)	Efetores negativos (inibidores)
Frutose–1,6–bifosfato	ATP
Frutose–2,6–bifosfato	NADH
ADP	Citrato
AMP	Ácidos graxos de cadeia longa
Fosfato	H^+
K^+	Ca^+

A frutose–2,6–bifosfato é um potente ativador alostérico da atividade da fosfofrutocinase–1 (PFK–1) hepática e é sintetizada a partir da frutose–6–fosfato pela ação da *fosfofrutocinase–2* (PFK–2) em resposta a sinais hormonais correlacionados com os níveis de glicose no sangue. Quando os níveis de glicose sangüínea estão elevados, o estímulo hormonal (insulina) eleva os teores de frutose–2,6–bifosfato que aumentam a atividade da PFK–1 ativando a glicólise e reduzindo a atividade da enzima que catalisa a reação reversa, a frutose–1,6–bifosfatase (inibe a gliconeogênese, *ver* adiante).

Frutose-6-fosfato → Frutose-2,6-bifosfato (ATP → ADP; Fosfofrutocinase-2)

A PFK–2 é uma enzima bifuncional que atua como fosfatase quando fosforilada em resposta ao hormônio glucagon e como cinase quando defosforilada em resposta ao hormônio insulina.

Como a fosforilação catalisada pela fosfofrutocinase-1 é irreversível, a reação inversa, a hidrólise da frutose–1,6–bifosfato em frutose–6–fosfato e fosfato inorgânico, é catalisada por uma enzima distinta, a *frutose–1,6–bifosfatase:*

Frutose–1,6–bifosfato + H_2O $\xrightarrow{\text{Frutose–6–bifosfatase}}$

Frutose–6–fosfato + P_i

A frutose–1,6–bifosfatase é importante na via gliconeogênese (*ver* adiante) – e é inibida alostericamente pelo AMP e pela frutose–2,6–bifosfato.

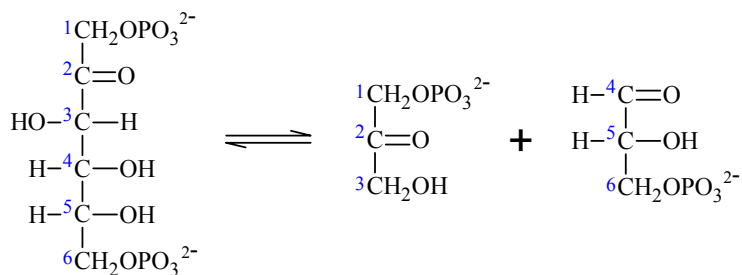
4. Clivagem da Frutose–1,6–bifosfato. A frutose-1,6-bifosfato é clivada entre os carbonos 3 e 4 para produzir duas trioses: o *gliceraldeído–3–fosfato* (GAP) e *diidroxiacetona–fosfato* (DHAP) pela ação da enzima *aldolase.* O substrato é mostrado em cadeia aberta para a melhor visualização da reação:

$^{1}CH_2OPO_3^{2-}$
$^{2}C{=}O$
$HO{-}^{3}C{-}H$
$H{-}^{4}C{-}OH$
$H{-}^{5}C{-}OH$
$^{6}CH_2OPO_3^{2-}$

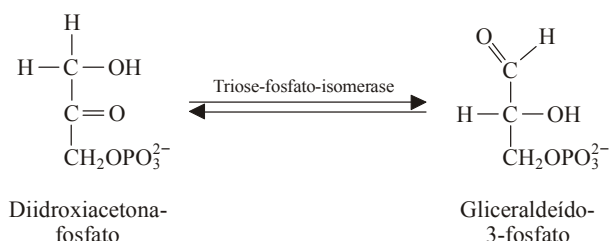
$\rightleftharpoons$

$^{1}CH_2OPO_3^{2-}$
$^{2}C{=}O$
$^{3}CH_2OH$

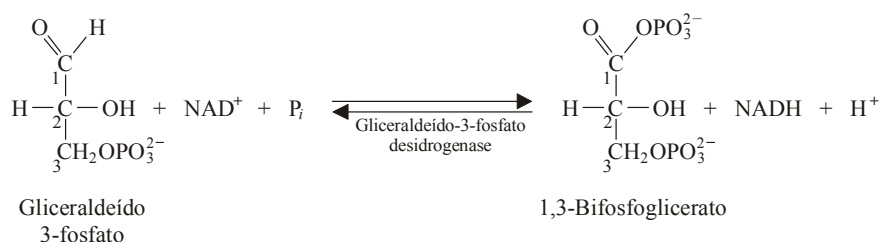
+

$H{-}^{4}C{=}O$
$H{-}^{5}C{-}OH$
$^{6}CH_2OPO_3^{2-}$

A reação é não–favorável ($\Delta G°' = +23,8\ kJ\cdot mol^{-1}$) mas procede porque os produtos são rapidamente removidos.

5. Interconversão do gliceraldeído–3–fosfato e da diidroxiacetona fosfato (DHAP). A enzima *triose–fosfato–isomerase* catalisa a interconversão por isomerização do gliceraldeído–3–fosfato e da diidroxiacetona–fosfato. A reação dirige a diidroxiacetona–fosfato para o gliceraldeído–3–fosfato, pois esse é o único que pode ser diretamente degradado nas etapas subseqüentes da glicólise:

$$\text{Diidroxiacetona-fosfato} \underset{\text{Triose-fosfato-isomerase}}{\rightleftharpoons} \text{Gliceraldeído-3-fosfato}$$

A diidroxiacetona–fosfato por sua transformação em glicerol–3–fosfato, torna-se essencial na biossíntese dos triacilgliceróis e fosfolipídios (*ver* Capítulo 9: Metabolismo dos lipídios).

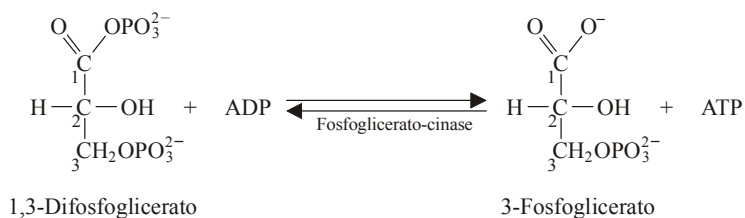
6. Oxidação do gliceraldeído–3–fosfato a 1,3–bifosfoglicerato (1,3–BPG). Essa etapa é a única reação de oxidação da glicólise. O gliceraldeído–3–fosfato é oxidado a 1,3–bifosfoglicerato com a concomitante redução de um mol de NAD^+ a NADH, pela enzima *gliceraldeído–3–fosfato–desidrogenase:*

$$\text{Gliceraldeído 3-fosfato} + NAD^+ + P_i \underset{\text{Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase}}{\rightleftharpoons} \text{1,3-Bifosfoglicerato} + NADH + H^+$$

A reação oxida o aldeído e incorpora um fosfato inorgânico com a produção do primeiro composto de "alta energia" da via, o *1,3–bifosfoglicerato* (1,3–BPG).

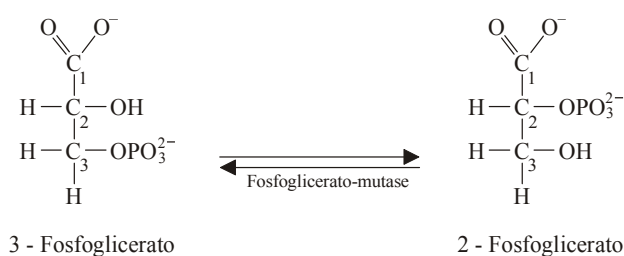
O NADH formado necessita ser reoxidado para a continuação da via glicolítica, que ocorre por duas vias: (a) a oxidação pela cadeia mitocondrial transportadora de elétrons ou (b) pela transformação do piruvato em lactato.

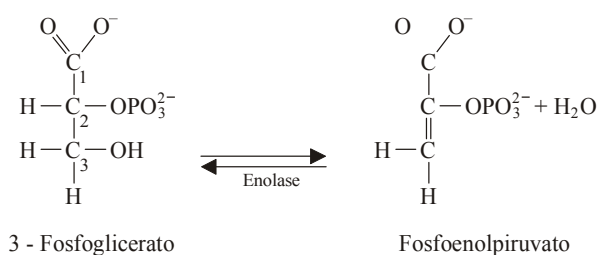
A partir do 1,3–bifosfoglicerato é sintetizado o 2,3–bifosfoglicerato, presente nos eritrócitos e um importante regulador da ligação do oxigênio à hemoglobina. Os efeitos regulatórios do 2,3–bifosfoglicerato são semelhantes aos exercidos pela frutose–2,6–bifosfato sobre a PFK–1.

7. Formação de ATP a partir do 1,3–bifosfoglicerato. A *fosfoglicerato–cinase* catalisa a transferência do fosfato do 1,3–bifosfoglicerato para o ADP gerando o primeiro ATP da via junto com o 3–fosfoglicerato:

$$\text{1,3-Difosfoglicerato} + ADP \underset{\text{Fosfoglicerato-cinase}}{\rightleftharpoons} \text{3-Fosfoglicerato} + ATP$$

A reação é reversível em condições fisiológicas pois as energias livres de hidrólise do ATP e do 1,3−bifosfoglicerato apresentam magnitudes semelhantes. A produção de ATP pela transferência direta de fosfato do substrato (1,3−bifosfoglicerato) para o ADP em ausência de oxigênio, é denominada *fosforilação ao nível do substrato*. Nessa etapa são gerados dois ATP por molécula de glicose.

8. Conversão do 3−fosfoglicerato a 2−fosfoglicerato (2PG). O 3−fosfoglicerato é convertido reversivelmente a 2−fosfoglicerato pela ação da *fosfoglicerato−mutase* que requer a presença de 2,3−bifosfoglicerato (*ver* acima) para a sua ação:

$$\text{3 - Fosfoglicerato} \underset{\text{Fosfoglicerato-mutase}}{\rightleftharpoons} \text{2 - Fosfoglicerato}$$

9. Desidratação do 2−fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato (PEP). A *enolase* catalisa a remoção reversível de uma molécula de água do 2−fosfoglicerato para formar o segundo intermediário de "alta energia", o fosfoenolpiruvato:

$$\text{3 - Fosfoglicerato} \underset{\text{Enolase}}{\rightleftharpoons} \text{Fosfoenolpiruvato} + H_2O$$

A reação é reversível apesar do elevado conteúdo energético do fosfoenolpiruvato.

10. Formação do piruvato. A transferência do grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para o ADP formando piruvato e ATP é catalisada pela enzima *piruvato−cinase* (PK) e presença de Mg^{2+} ou Mn^{2+} e K^+:

$$\text{Fosfoenolpiruvato} + ADP \xrightarrow{\text{Piruvato-cinase}} \text{Piruvato} + ATP$$

Fosfoenolpiruvato ($^{-}OOC{-}C(OPO_3^{2-}){=}CH_2$) Piruvato ($^{-}OOC{-}C(=O){-}CH_3$)

Sob condições fisiológicas, a reação é altamente exergônica, fornecendo energia livre suficiente para a formação de ATP. Essa é a segunda reação da glicólise que fosforila o ATP ao nível do substrato. Nesse estágio são gerados dois ATP por molécula de glicose.

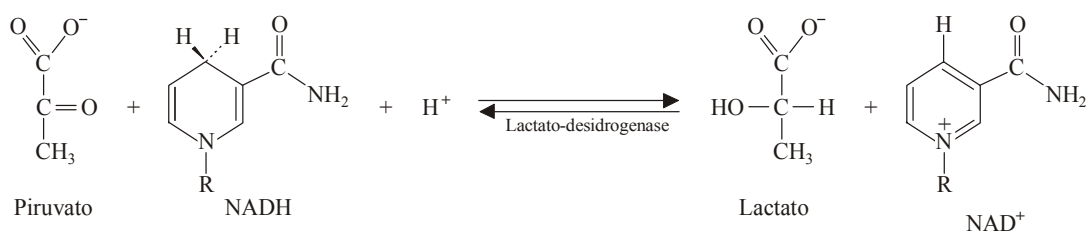
A piruvato–cinase é uma enzima alostérica ativada por níveis elevados de frutose–1,6–bifosfato e inibida pelo ATP e alanina. A piruvato–cinase também é modulada por uma *proteína-cinase dependente de AMPc*. Em teores diminuídos de glicemia, o *glucagon* eleva os níveis intracelulares de AMPc promovendo a fosforilação e inibição da piruvato–cinase. Desse modo, a glicólise é interrompida e o piruvato é desviado para a síntese da glicose pela gliconeogênese que, por sua vez, é também estimulada pelo glucagon. A piruvato–cinase é reativada por defosforilação realizada por uma *fosfoproteína–fosfatase.*

B. Redução do piruvato em lactato

O piruvato pode seguir várias vias metabólicas. Nos tecidos que funcionam sob condições anaeróbicas, como o músculo esquelético durante atividades físicas vigorosas, o piruvato é reduzido a lactato para gerar novamente NAD^+ (fermentação homoláctica) o que permite a continuação da glicólise com baixa produção de ATP.

A redução do piruvato a lactato é catalisada pela *lactato–desidrogenase* com o emprego de NADH como agente redutor*:*

$$\text{Piruvato} + NADH + H^+ \underset{\text{Lactato-desidrogenase}}{\rightleftharpoons} \text{Lactato} + NAD^+$$

Piruvato NADH Lactato NAD^+

O NADH utilizado na redução é gerado durante a glicólise na oxidação do gliceraldeído–3–fosfato a gliceraldeído–1,3–bifosfato (Figura 6.4).

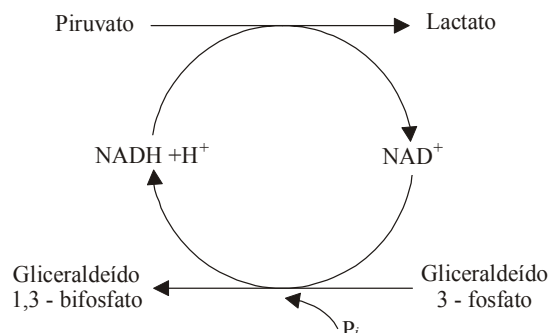



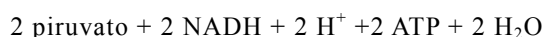
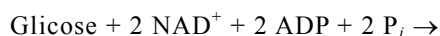
Figura 6.5
Reciclagem do NADH na glicólise anaeróbica. O NADH produzido na conversão do gliceraldeído–3–fosfato a gliceraldeído–1,3–bifosfato é oxidado quando o piruvato é convertido a lactato.

Essa reação é a principal opção empregada pelas células sob condições hipóxicas como em músculos esqueléticos submetidos à atividade intensa, por exemplo, para a reoxidação do NADH a NAD^+ no citosol e, assim, prosseguir produzindo ATP pela glicólise. O lactato formado no músculo ativo difunde para o sangue e é transportado até o fígado, onde é convertido em glicose pela gliconeogênese (*ver* adiante).

Alguns tecidos como os eritrócitos, mesmo sob condições aeróbicas, produzem lactato como produto final da glicólise.

C. Rendimento energético da glicólise

Durante a glicólise, a energia livre liberada na transformação de uma molécula de glicose a dois piruvato é conservada na forma de dois ATP. A variação de energia livre é $\Delta G^{0'} = -135{,}6$ kJ·mol^{-1} em todo o processo. Parte da energia liberada é dissipada como calor. A equação é:

$$\text{Glicose} + 2\ NAD^+ + 2\ ADP + 2\ P_i \rightarrow$$
$$2\ \text{piruvato} + 2\ NADH + 2\ H^+ + 2\ ATP + 2\ H_2O$$

Reações	ATP/mol de glicose
Fosforilação da glicose	−1
Fosforilação da frutose–6–fosfato	−1
2(1,3–Bifosfoglicerato → 3–fosfoglicerato)	+2
2(Fosfoenolpiruvato → piruvato)	+2
Total líquido	+2

A Tabela 6.1 mostra as variações de energia livre de cada reação da glicólise em condições fisiológicas (ΔG) e no estado-padrão ($\Delta G^{\circ'}$). Parte das reações são endergônicas ($\Delta G^{\circ'} < 0$). Entretanto, quando a variação de energia livre real (ΔG) de cada reação é calculada a partir de suas concentrações fisiológicas intracelulares, somente três reações (triose-fosfato-isomerase, fosfoglicerato–cinase

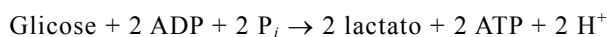
e fosfoglicerato–mutase) necessitam energia, mesmo assim, em pequenas quantidades.

Tabela 6.1 – Variação de energia livre padrão e da energia livre real de cada reação de glicólise.

Enzima	Variação de energia livre (kJ·mol^{-1})	
	$\Delta G°'$ (estado-padrão)	ΔG (condições fisiológicas)
Hexocinase	−16,7	−33,4
Glicose−6−fosfato−isomerase	+1,7	−2,5
Fosfofrutocinase	−14,2	−22,2
Aldolase	+23,8	-1,3
Triose−fosfato−isomerase	+7,5	+2,5
Gliceraldeído−3−fosfato-desidrogenase	+6,3	−1,7
Fosfoglicerato−cinase	−18,8	+1,3
Fosfoglicerato−mutase	+4,6	+0,8
Enolase	+1,7	−3,3
Piruvato−cinase	−31,4	−16,7

No transcorrer da via glicolítica em condições aeróbicas, dois NAD^+ são reduzidos a dois NADH. Os NADH produzidos são reoxidados em NAD^+ pela transferência de seus elétrons para a *cadeia mitocondrial transportadora de elétrons.* A energia livre liberada no processo é utilizada para a síntese de ATP a partir de ADP pela fosforilação oxidativa (*ver* Capítulo 8).

Em condições anaeróbicas, as células do músculo esquelético degradam a glicose a lactato e tem $\Delta G°' = -196$ kJ·mol^{-1}:

$$\text{Glicose} + 2\ \text{ADP} + 2\ \text{P}_i \rightarrow 2\ \text{lactato} + 2\ \text{ATP} + 2\ \text{H}^+$$

Em condições aeróbicas, o piruvato não é transformado em lactato e sim transferido para a mitocôndria onde é convertido em acetil–CoA com posterior oxidação a CO_2 e H_2O no ciclo do ácido cítrico.

D. Regulação da glicólise

A regulação da glicólise é complexa pela sua importância na geração de energia na forma de ATP e pela produção de vários intermediários glicolíticos destinados a biossíntese. Na maioria das células, a velocidade da glicólise é determinada, principalmente, pela regulação alostérica das enzimas *hexocinase, fosfofrutocinase−1* (PFK−1) e *piruvato−cinase.* As reações catalisadas por essas enzimas são irreversíveis e podem ser "ligadas" ou "desligadas" por efetores alostéricos. Por exemplo, a hexocinase é inibida pelo excesso de glicose-6-fosfato. Vários compostos de "alta energia" atuam como efetores alostéricos. Por exemplo, elevadas concentrações de AMP (um indicador de baixa produção de energia) ativa a PFK−1 e a

piruvato−cinase. Por outro lado, teores elevados de ATP (um indicador que as necessidades energéticas das células foram atingidas) inibem as duas enzimas. O citrato e a acetil−CoA, que acumulam quando existe ATP em quantidade suficiente, inibem a PFK−1 e a piruvato−cinase, respectivamente. A frutose−2,6−bifosfato, produzida por indução de hormônio da PFK−2, é um indicador de altos níveis de glicose disponível e alostericamente ativa a PFK−1. O acúmulo de frutose−1,6−bifosfato ativa a piruvato−cinase, promove um mecanismo de controle (a frutose−1,6−bifosfato é um ativador alostérico). Na Figura 6.6 é mostrada a ação de cada inibidor ou ativador sobre as enzimas reguladores.

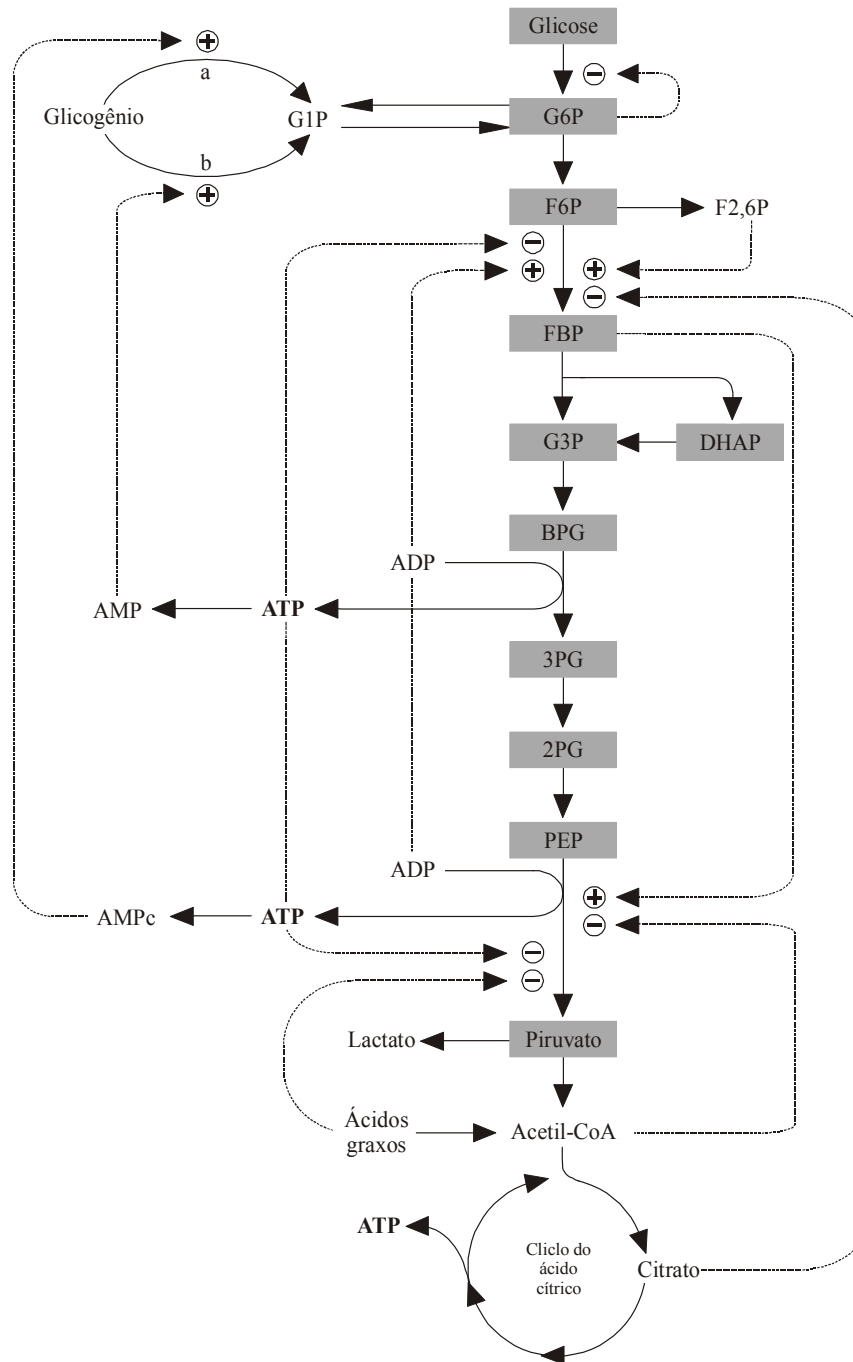



Figura 6.6
Características regulatórias da glicólise.

Após uma refeição rica em carboidratos, a *insulina* promove o aumento na síntese das enzimas *glicocinase, fosfofrutocinase–1* e

Metabolismo do álcool

O álcool é sintetizado por leveduras por meio da *fermentação alcoólica*. É um processo em duas etapas em que a *piruvato-descarboxilase* remove o grupo carboxilato do piruvato para produzir acetaldeído.

Piruvato → acetaldeído

A enzima requer Mg^{2+} e a pirofosfato de tiamina (TPP).
A *álcool-desidrogenase* catalisa a transformação do acetaldeído em etanol:

Acetaldeído → etanol

O etanol é considerado um produto de excreção do metabolismo da glicose; seu acúmulo é tóxico aos organismos que o produzem.

piravato–cinase. Por outro lado, a síntese dessas mesmas enzimas é reduzida quando o *glucagon* plasmático está aumentado e a insulina reduzida, como no jejum ou diabetes.

E. Destino do piruvato

O piruvato formado na glicólise e de outras fontes é utilizado em diferentes vias metabólicas dependendo de vários fatores e necessidades momentâneas de certos metabólitos–chave. Os principais destinos são: síntese de *lactato* (glicólise em condições anaeróbicas), *acetil–CoA* (ciclo do ácido cítrico), *oxaloacetato* (gliconeogênese) e *alanina* (síntese de aminoácidos) (Figura 6.6).

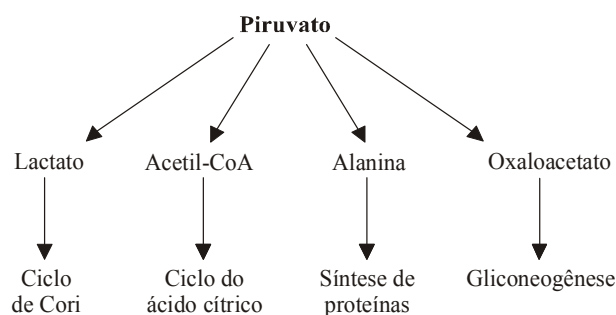



Figura 6.6
Destinos do piruvato.

6.3 Glicogênese

A *glicogênese* é a síntese intracelular do glicogênio. O glicogênio é um polissacarídio composto de unidades repetidas de D–glicose unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ com ramificações formadas por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ a cada 8 a 14 resíduos. Constitui a principal forma de reserva de polissacarídeos nos tecidos animais.

O glicogênio é sintetizado em quase todos os tecidos animais, mas os maiores depósitos estão presentes no fígado e músculos esqueléticos. O glicogênio é armazenado em grânulos intracelulares que também contêm as enzimas que catalisam as reações para a sua síntese e degradação. A glicose armazenada sob a forma de glicogênio no fígado e músculos destinam-se a diferentes funções:

- *Glicogênio hepático.* Atua como reservatório de glicose para a corrente sangüínea com a distribuição para outros tecidos. A quantidade de glicogênio hepático varia amplamente em resposta à ingestão de alimentos. Acumula após as refeições e, quando necessário, é degradado lentamente para manter a concentração de glicose no sangue mais ou menos constante. As reservas de glicogênio hepático no homem apresentam importante papel como fonte de glicose no período entre as refeições e, em maior extensão, durante o jejum noturno (isto é, 8-16 horas).

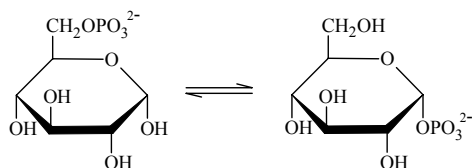
- *Glicogênio muscular.* Serve como combustível para gerar ATP durante a atividade muscular aumentada. É formado durante o repouso após as refeições. Os níveis de glicogênio muscular

apresentam menor variabilidade do que os teores hepáticos em resposta a ingestão de carboidratos.

A. Reações da glicogênese

A síntese do glicogênio ocorre após as refeições, quando os teores de glicose sangüínea estão elevados. Até recentemente, presumia-se que a glicose sangüínea era a única precursora direta nesse processo. Entretanto, em condições fisiológicas, grande parte do glicogênio é produzido por um mecanismo envolvendo a seqüência: *glicose da dieta → molécula C_3 → glicogênio hepático*. O lactato e a alanina são as principais moléculas-C_3 nesse processo (*ver* gliconeogênese). O lactato é formado nos eritrócitos por glicólise e é captado pelo fígado e convertido em glicose–6–fosfato na gliconeogênese. A discussão a seguir mostra a síntese do glicogênio a partir da glicose-6-fosfato derivada da glicose livre pela ação da glicocinase (no fígado) ou da hexocinase (no músculo).

1. Síntese da glicose–1–fosfato. A glicose–6–fosfato é convertida reversivelmente a *glicose–1–fosfato* pela *fosfoglicomutase,* uma enzima que contém um grupo fosforil ligado a um resíduo serina reativo:

$CH_2OPO_3^{2-}$ O OH OH OH OH ⇌ CH_2OH O OH OH OPO_3^{2-} OH

O grupo fosforil da enzima é transferido para a glicose–6–fosfato com a formação de *glicose–1,6–bifosfato* (G1,6P) como intermediário. Na síntese de glicose–1–fosfato, o grupo fosforil ligado ao C6 retorna ao resíduo serina da enzima.

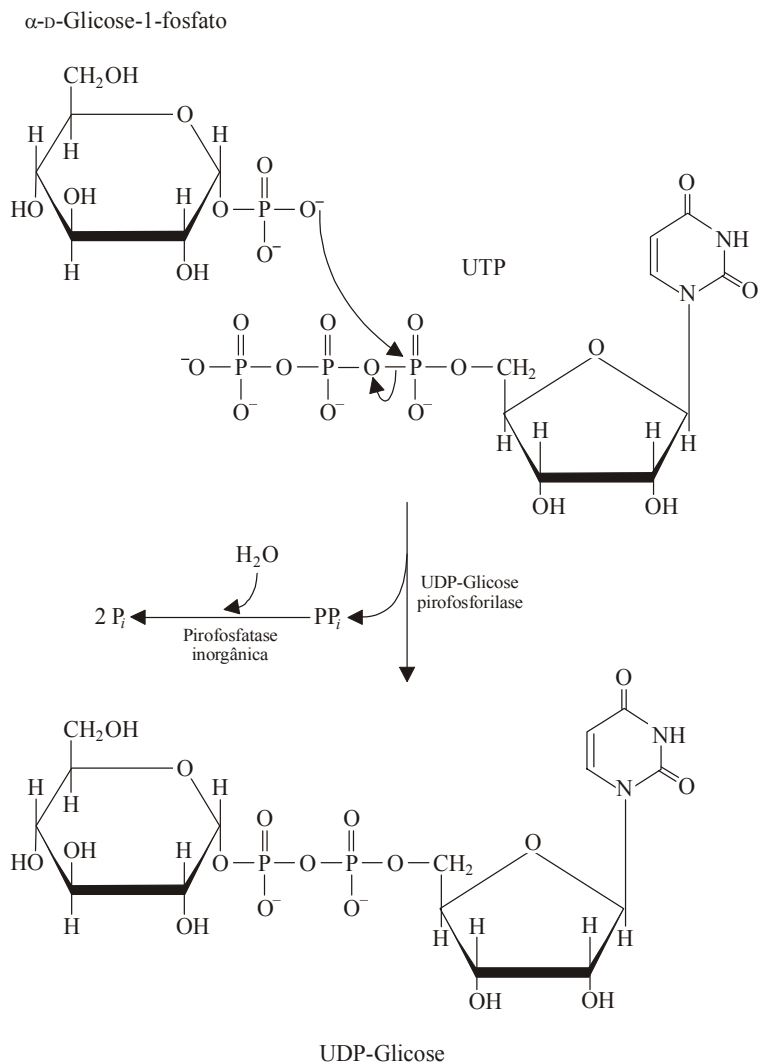
2. Síntese de uridina–difosfato-glicose (UDP–glicose ou UDPG). Em presença da *UDP–glicose–pirofosforilase,* a glicose–1–fosfato reage com a trifosfato de uridina (UTP), para produzir *UDP–glicose* uma forma "ativada" de glicose. A UDP–glicose é um composto doador de unidade glicosil para biossíntese de glicogênio. O UDP está ligado ao C1 da glicose conforme reação descrita por Leloir em 1957:

α-D-Glicose-1-fosfato

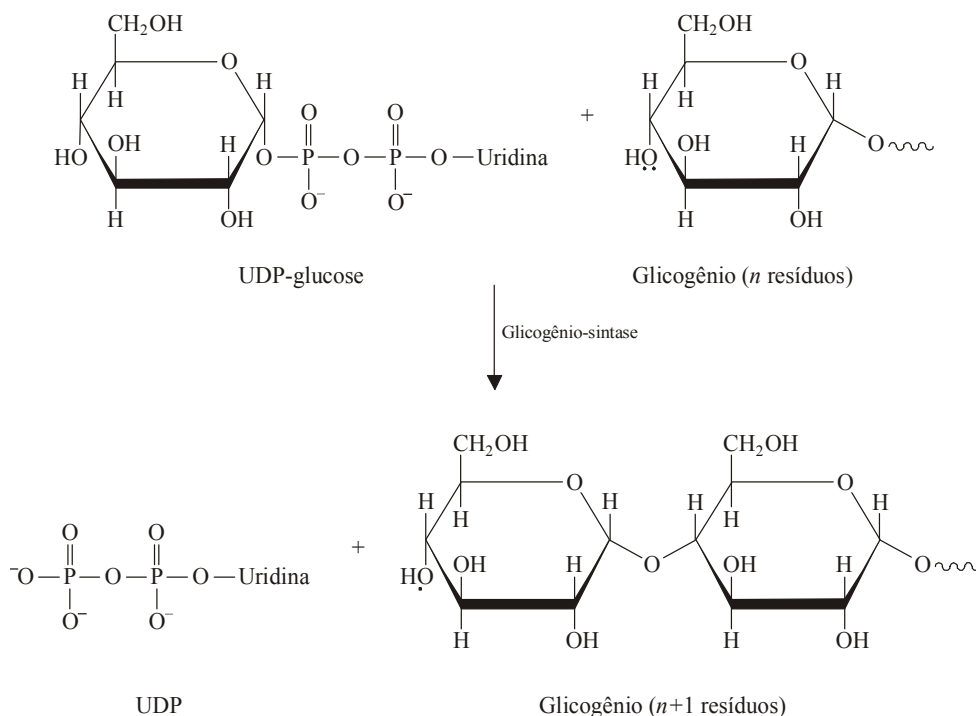
UTP

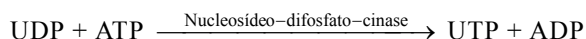
H_2O

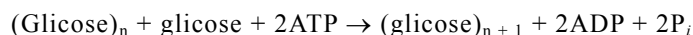
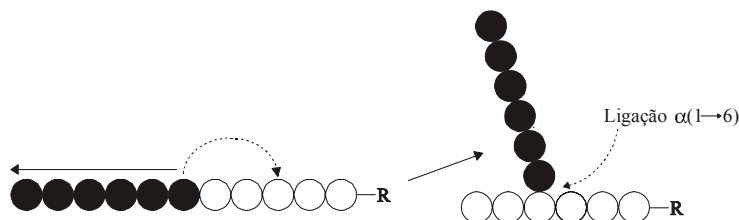
2 P_i ← Pirofosfatase inorgânica — PP_i ← UDP-Glicose pirofosforilase

UDP-Glicose

O pirofosfato inorgânico (PP_i) derivado da UTP, sofre hidrólise exergônica a dois fosfatos ($PP_i + H_2O \rightarrow 2P_i$) pela ação da *pirofosfatase–inorgânica* celular. A variação de energia livre padrão da hidrólise do PP_i é $\Delta G^{0'} = -33{,}5\ kJ \cdot mol^{-1}$, grande o suficiente para dirigir a reação de síntese de UDPG.

3. Síntese do glicogênio a partir de UDP-glicose. A unidade glicosil de UDP–glicose é transferida para uma extremidade não–redutora do glicogênio já existente. Isso resulta na anexação de uma nova unidade de glicose, ligada pelo C1 ao C4, $\alpha(1\rightarrow4)$, da glicose terminal do polímero de glicogênio pré-formado em reação catalisada pela *glicogênio-sintase:*

UDP-glucose + Glicogênio (n resíduos) $\xrightarrow{\text{Glicogênio-sintase}}$ UDP + Glicogênio (n+1 resíduos)

A UDP é reconvertida a UTP à custa de ATP por meio de uma reação de transferência do grupo fosforil catalisada pela *nucleosídio–difosfato–cinase*:

$$\text{UDP + ATP} \xrightarrow{\text{Nucleosídeo–difosfato–cinase}} \text{UTP + ADP}$$

Desse modo, o custo total em ATP, para a incorporação de um resíduo de glicose ao glicogênio é dado pela equação:

$$(\text{Glicose})_n + \text{glicose} + 2\text{ATP} \rightarrow (\text{glicose})_{n+1} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i$$

O glicogênio é uma estrutura amplamente ramificada com pontos de ramificações a cada 8 a 14 resíduos. A ramificação é resultante da ação da enzima *amilo-(α–1,4→α–1,6) –transglicosilase (enzima de ramificação*). Essa enzima transfere um fragmento de 6 ou 7 resíduos de glicose, da extremidade não-redutora de uma cadeia para o grupo OH do C6 de uma unidade de glicose na mesma ou em outra cadeia de glicogênio, de modo a formar um enlace α(1→6) onde é estabelecido um ponto de ramificação. Esquematicamente tem-se (cada esfera representa uma unidade de glicose):

Após a ocorrência de ramificações, unidades de glicose podem ser acrescentadas a partir de resíduos glicosil provenientes da UDP−glicose aos terminais não−redutores de cada uma das cadeias originais ou das ramificações, por meio da glicogênio−sintase. Quando um número suficiente de unidades são adicionadas desse modo, ocorrem novas ramificações.

A síntese de glicogênio necessita a existência de uma cadeia de glicogênio já constituída, à qual são adicionados novos resíduos de glicose. Na primeira etapa da síntese, uma *glicosil−transferase* liga o primeiro resíduo de glicose a um grupo OH de uma proteína chamada *glicogenina* que atua como molde inicial. Essa, por autocatálise, incorpora novos resíduos de glicose, até formar uma pequena cadeia de até sete resíduos doados pela UDP-glicose, produzindo uma molécula nascente de glicogênio. Nesse ponto, a glicogênio−sintase inicia a síntese do glicogênio, enquanto a glicogenina desliga-se do polímero.

6.4 Glicogenólise

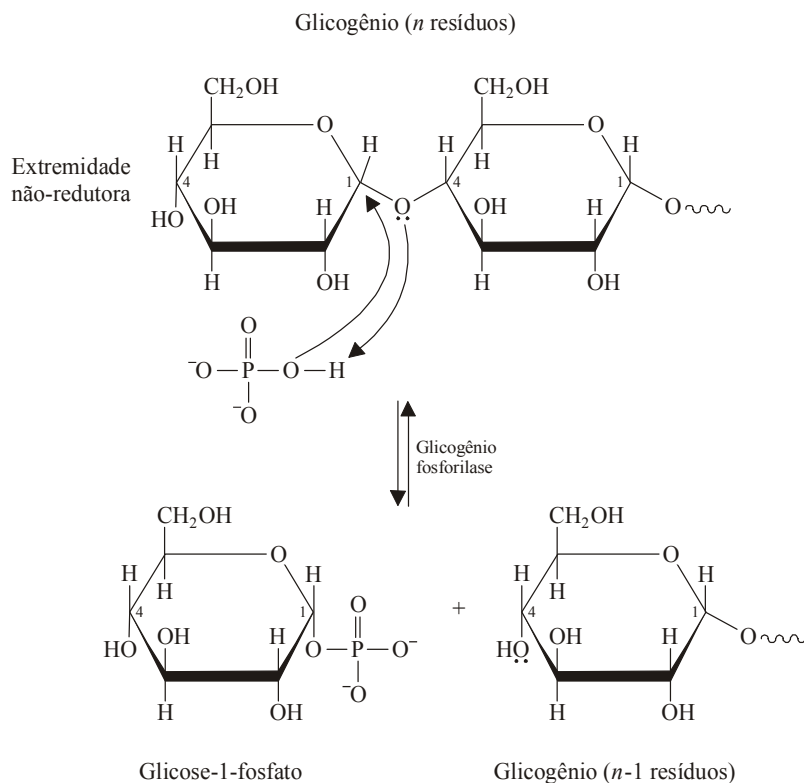
A degradação do glicogênio consiste na clivagem seqüencial de resíduos de glicose, a partir das extremidades não−redutoras das ramificações do glicogênio (existe uma extremidade não-redutora para cada ramificação) e é denominada *glicogenólise.* O rompimento das ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ ocorre por fosforólise com formação de *α−D−glicose−1−fosfato* sob a ação da enzima *glicogênio−fosforilase* e o ataque do fosfato inorgânico.

Glicogênio (n resíduos)

Extremidade não-redutora

Glicogênio fosforilase

Glicose-1-fosfato

Glicogênio (n-1 resíduos)

A glicogênio–fosforilase age em presença de íons magnésio e *piridoxal–5'–fosfato,* uma coenzima cujo grupo fosfato atua como um catalisador ácido geral, promovendo o ataque da ligação glicosídica pelo P_i.

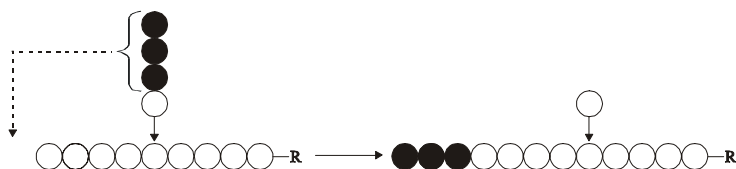
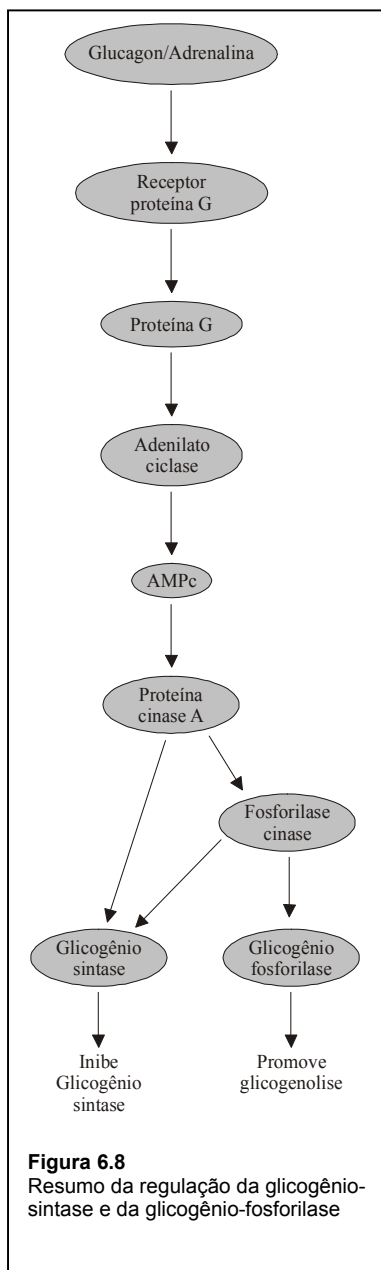
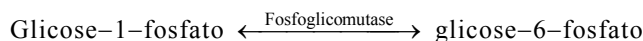
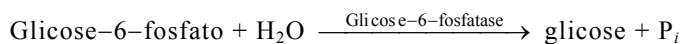
A glicogênio-fosforilase remove unidades sucessivas de glicose ao longo da cadeia até restarem quatro resíduos de um ponto de ramificação $\alpha(1\rightarrow6)$. A continuação da degradação ocorre depois da transferência de uma unidade de três resíduos de glicose da ramificação sob a ação da *enzima de desramificação do glicogênio*, para a extremidade não-redutora de outra ramificação, ou seja, acontece o rompimento de uma ligação $\alpha(1\rightarrow4)$ com a formação de uma nova ligação $\alpha(1\rightarrow4)$. Em sua nova posição, os resíduos de glicose são liberados pela ação da glicogênio-fosforilase.

A remoção do resíduo glicosil restante ligado à cadeia principal por $\alpha(1\rightarrow6)$ é realizada por hidrólise (e não fosforólise) pela mesma enzima de desramificação com a formação de glicose e glicogênio

Figura 6.8
Resumo da regulação da glicogênio-sintase e da glicogênio-fosforilase

não-ramificado. Desse modo, é explicado o aparecimento de pequenas quantidades de glicose livre (8−10%) em vez de glicose−1−fosfato na degradação do glicogênio.

O produto final das reações de degradação do glicogênio é a glicose−1−fosfato que é convertida em glicose−6−fosfato pela *fosfoglicomutase:*

$$\text{Glicose−1−fosfato} \xleftrightarrow{\text{Fosfoglicomutase}} \text{glicose−6−fosfato}$$

A fosfoglicomutase requer a glicose−1,6−bifosfato que exerce papel análogo ao do 2,3−bifosfoglicerato na reação catalisada pela fosfogliceromutase (*ver* Glicólise).

A glicose−6−fosfato pode ser utilizada pela glicólise ou pela via das pentoses-fosfato (*ver* adiante). No fígado, a glicose-6-fosfato também sofre a ação da *glicose−6−fosfatase* para formar glicose:

$$\text{Glicose−6−fosfato} + H_2O \xrightarrow{\text{Glicose−6−fosfatase}} \text{glicose} + P_i$$

A glicose resultante é liberada da célula para a circulação e transportada para outros tecidos.

6.5 Regulação do metabolismo do glicogênio

A síntese e a degradação do glicogênio são cuidadosamente reguladas para evitar a perda de energia. As enzimas das diferentes vias, a *glicogênio−fosforilase* e a *glicogênio−sintase* nas formas *a* (ativa) e *b* (inativa ou pouco ativa), são reguladas pelo *controle alostérico* e pela *modificação covalente das enzimas modulada por hormônios*.

A atividade dessas enzimas é, também, amplamente dependente da disponibilidade de vários intermediários e co-fatores. Portanto, a glicogênese e a glicogenólise são reguladas de tal modo que as quantidades de glicose liberadas são ajustadas segundo as necessidades do organismo.

1. Controle alostérico. A glicogênio-sintase e a glicogênio-fosforilase estão sob controle alostérico por diferentes efetores. A forma inativa (ou pouco ativa) da glicogênio-fosforilase encontrada no músculo em repouso, é denominada *glicogênio−fosforilase b,* e é ativada por *AMP* e inibida por *ATP* e *glicose−6−fosfato*. A glicogênio−sintase, ao contrário, é ativada pela *glicose−6−fosfato*. Desse modo, em presença de teores baixos de ATP e de glicose−6−fosfato, mas elevados de AMP, a glicogênio−fosforilase é estimulada e a glicogênio−sintase é inibida, o que favorece a degradação do glicogênio. Por outro lado, quando os teores de ATP e glicose−6−fosfato estão elevados, a glicogênio-sintase é estimulada e favorece a síntese do glicogênio.

2. Regulação por modificação covalente. A interconversão das formas *a* e *b* da glicogênio-sintase e da glicogênio−fosforilase é regulada reciprocamente por meio de fosforilação−defosforilação (quando uma enzima é estimulada a outra é inibida) e são catalisadas por enzimas que estão sob controle hormonal (insulina, glucagon e adrenalina) ou estímulo nervoso (íons Ca^{2+}).

A ativação da glicogênio-fosforilase emprega três enzimas: *fosforilase–cinase, proteína–cinase dependente de AMPc* e *fosfoproteína–fosfatase 1.*

A *fosforilase–cinase* é uma proteína constituída por quatro subunidades diferentes, nominadas α, β, γ e δ. A subunidade catalítica é a γ, enquanto as outras três subunidades têm funções reguladoras da atividade da enzima. A fosforilase-cinase é convertida da forma inativa para a forma ativa por um dos dois mecanismos:

- Fosforilação das subunidades α e β pela ação da *proteína–cinase dependente de AMPc* é ativada pelo *AMP cíclico* formado sob estímulo da adrenalina. A subunidade γ não é fosforilada.
- Os íons Ca^{2+} (o sinal para o início da contração muscular) ligam-se à subunidade δ através da *calmodulina* (*cal*cium–*modul*ating prote*in*) – uma proteína que sofre modificações conformacionais quando ligada ao cálcio.

A degradação do glicogênio ocorre quando a *glicogênio–fosforilase b* menos ativa é convertida na forma mais ativa, a *glicogênio–fosforilase a,* pela forma ativa da enzima *fosforilase–cinase* e *ATP*. Além das alterações conformacionais, p processo envolve a adição de fosfato a glicogênio-fosforilase b. Mais precisamente, a glicogênio–fosforilase *b* é um dímero (duas subunidades peptídicas) não fosforilado, enquanto a fosforilase *a* é fosforilada em cada uma das subunidades:

Glicogênio-fosforilase *b* + 2 ATP →

glicogênio–fosforilase *a* + 2 ADP

A fosforilase *a* pode ser convertida novamente em fosforilase *b* pela enzima hepática *fosfoproteína–fosfatase 1:*

$$\text{Glicogênio–fosforilase } a + H_2O \xrightarrow{\text{Fosfoproteína–fosfatase1}}$$

$$2 \text{ glicogênio–fosforilase } b + 2\,P_i$$

A forma ativa da fosforilase-cinase também tem um precursor inativo ativado pela *proteína–cinase dependente de AMPc*.

No músculo em repouso, a atividade da proteína–cinase dependente de AMPc está sob controle hormonal. O hormônio *adrenalina* afeta a seqüência orientando a ativação da fosforilase *a* pelo estímulo da enzima *adenilato–ciclase* que catalisa a conversão do ATP a AMP cíclico (AMPc)(*ver* Capítulo 4).

O AMPc ativa a proteína–cinase dependente de AMPc, que por sua vez, catalisa a fosforilação da fosforilase–cinase, dando origem à forma da fosforilase–cinase ativa, desencadeando uma série de passos que resultam na geração da glicogênio–fosforilase *a*. As atividades das fosforilases–cinases dependem da presença de Ca^{2+}, pois existe um estreito acoplamento entre a glicogenólise e a contração muscular. Como efeito final, os íons cálcio ativam a glicogênio–fosforilase e inativam a glicogênio–sintase.

A *glicogênio-sintase* também ocorre sob duas formas, *a* e *b*. A fosfatase-cinase, que ativa a glicogênio-fosforilase, também fosforila e inativa a glicogênio-sintase. Em presença da enzima, a

glicogênio–sintase *a* reage com o ATP para produzir a glicogênio–sintase *b* (fosforilada). Essa última pode ser reconvertida a glicogênio–sintase *a* pela ação da *fosfoproteína–fosfatase 1* (Figura 6.8).

Devido a seu efeito sobre a proteína-cinase dependente de AMPc, através da geração de AMP cíclico, a adrenalina inibe a síntese do glicogênio. A glicogênio-sintase e a glicogênio-fosforilase são afetadas pela fosforilação de modo diferente: a glicogênio-fosforilase *a* (ativa) está ligada ao fosfato, enquanto a glicogênio-sintase (ativa) está na forma desforilada. Como a formação de AMPc estimulado pela adrenalina transforma as duas enzimas (fosforilase e sintase) em formas fosforiladas, o resultado é a diminuição na síntese do glicogênio (pela inativação da sintase) e o aumento na degradação (pela ativação da fosforilase). A adrenalina, ao estimular a atividade da adenilato-ciclase, fornece glicose para as células através de dois mecanismos: (1) inibição do armazenamento na forma de glicogênio e (2) aumento no seu desdobramento.

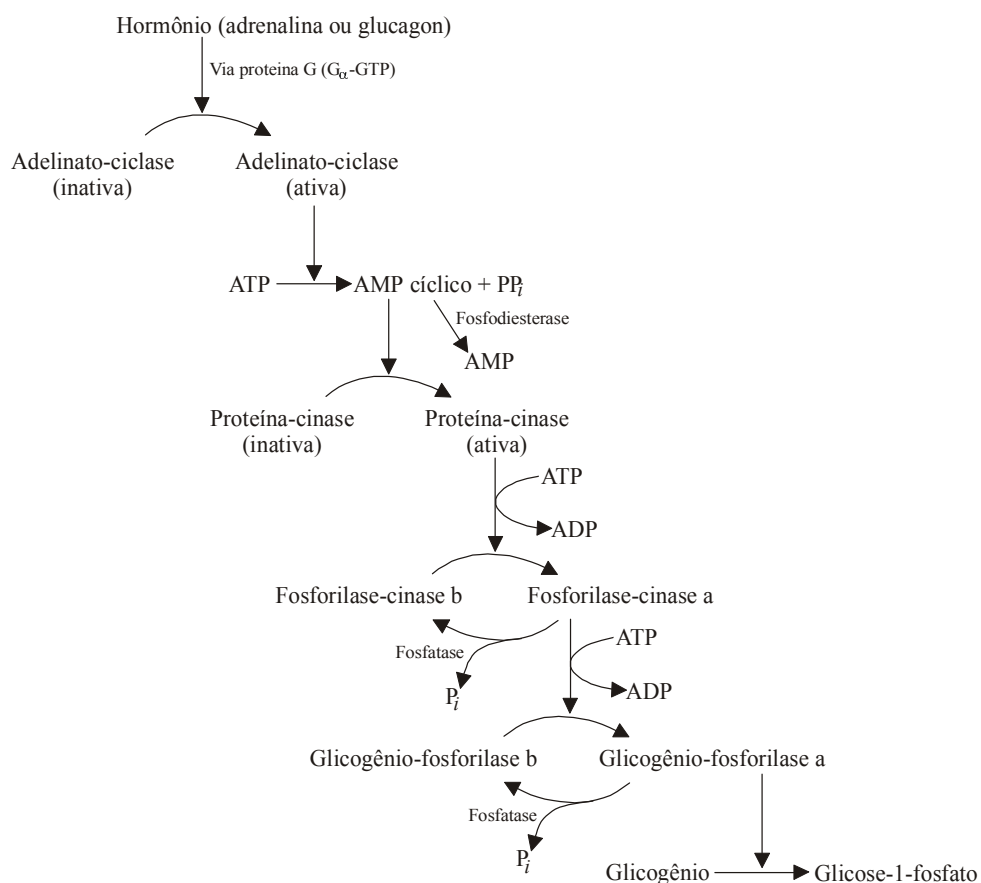



Figura 6.9
Regulação do metabolismo do glicogênio por modificação covalente das enzimas moduladas por hormônios.

Quadro 6.4 Doenças de armazenamento de glicogênio

Existem vários distúrbios hereditários que afetam o metabolismo do glicogênio. São causadas por deficiências de enzimas envolvidas na síntese e degradação do glicogênio, produzindo glicogênio anormal em quantidade ou qualidade.

Elas são coletivamente chamadas de doenças de armazenamento de glicogênio e a condição é conhecida como glicogenose. Essas condições são divididas em tipos distintos descritos na Tabela abixo

Tipo	Epônimo	Enzima deficiente	Características
I	Doença de von Gierke	Glicose−6−fosfatase	Pobre mobilização do glicogênio hepático. Hipoglicemia em jejum.
II	Doença de Pompe	α−1,4−Glicosidase (lisossomal)	Acúmulo de generalizado de glicogênio lisossomal.
III	Doença de Cori (dextrinose limite)	Amilo−α-1,6−glicosidase (enzima de desramificação)	Acúmulo de glicogênio com ramos externos curtos.
IV	Doença de Hendersen (amilopectinose)	Amilo−(1,4→1,6)-transglicosilase (enzima de ramificação)	Acúmulo de glicogênio hepático com ramos externos longos. Hipoglicemia em jejum.
V	Doença de McArdle	Glicogênio−fosforilase muscular	Cãimbras musculares durante exercícios.
VI	Doença de Her´s	Glicogênio−fosforilase hepática	Acúmulo de glicogênio hepático.
VII	Doença de Tarui	Fosfofrutocinase (muscular)	Acúmulo de glicogênio muscular.
VIII	-	Fosforilase−cinase (hepática)	Acúmulo de glicogênio hepático.
IX	Doença de Fanconi-Bickel	Fosforilase−cinase de todos os órgãos	Todos os órgãos
0		Glicogênio−sintase hepática	Deficiência da quantidade de glicogênio

Junto com a regulação descrita acima, a velocidade da síntese e degradação é profundamente influenciada por vários intermediários e co-fatores. Por exemplo, a UDP é um inibidor tanto da UDP−glicose−pirofosforilase como também da glicogênio-sintase hepática. A UDP formada na síntese do glicogênio a partir da UDP−glicose, atua como moderador da velocidade da síntese. O próprio glicogênio é um inibidor da ativação da glicogênio−sintase. Conseqüentemente, quantidades excessivas de glicogênio tendem a diminuir a velocidade de sua própria síntese.

6.6 Gliconeogênese

A *gliconeogênese,* a formação de novas moléculas de glicose a partir de precursores não-carboidratos, ocorre no fígado. Em certas situações, como acidose metabólica ou inanição, os rins também sintetizam glicose. Os precursores não-glicídicos incluem lactato, piruvato, glicerol e cadeias carbonadas da maioria dos aminoácidos. Entre as refeições, os teores adequados de glicose sangüínea são mantidos pela hidrólise do glicogênio hepático. Quando o fígado esgota seu suprimento de glicogênio (exemplo, jejum prolongado ou exercício vigoroso), a gliconeogênese fornece a quantidade apropriada de glicose para o organismo. O cérebro e os eritrócitos,

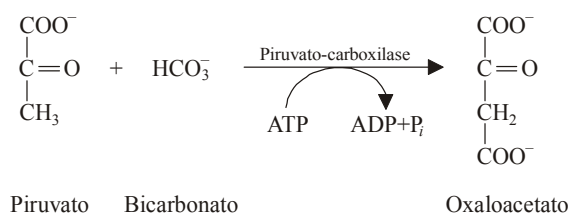
utilizam a glicose como fonte primária de energia. Sob circunstâncias especiais, as células do cérebro também usam corpos cetônicos (derivados dos ácidos graxos) para gerar energia. O músculo esquelético em exercício, emprega a glicose a partir do glicogênio em combinação com ácidos graxos e corpos cetônicos para obter energia.

A. Reações da gliconeogênese

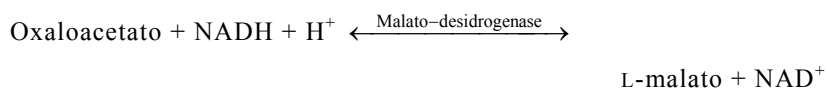
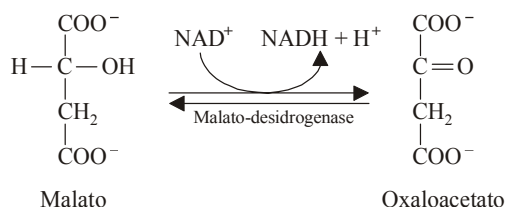
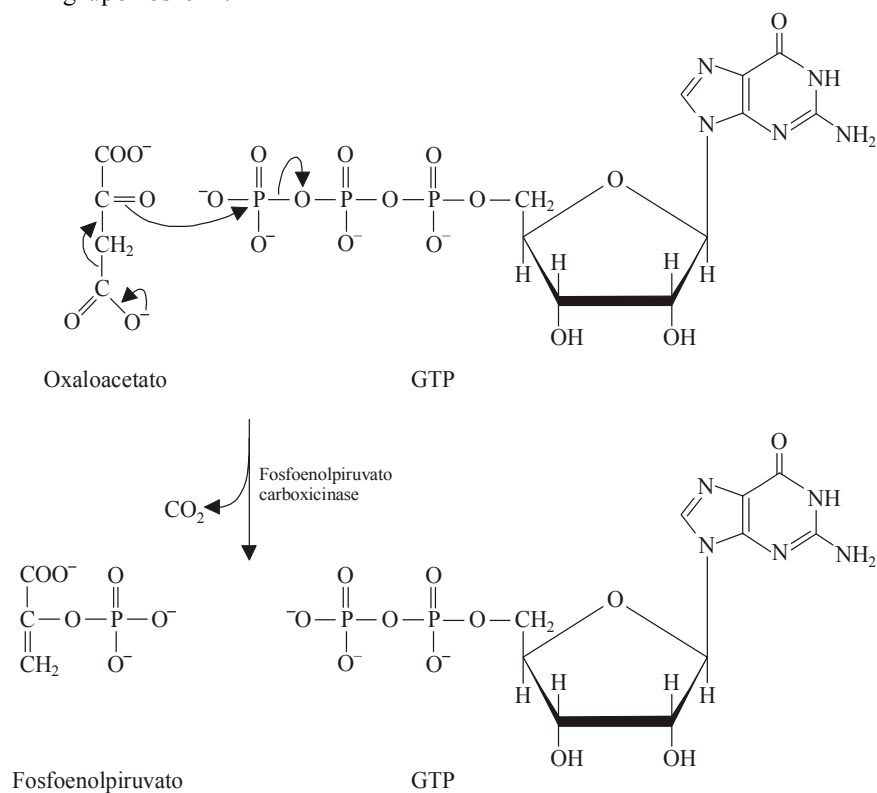
Considerando o piruvato como ponto inicial da gliconeogênese, as reações podem ser comparadas com as da via glicolítica mas, no sentido inverso. Muitas das enzimas e intermediários são idênticos. Sete reações são reversíveis. No entanto, três são irreversíveis: *piruvato–cinase* ($\Delta G°' = -31,4$ kJ·mol^{-1}), *fosfofrutocinase–1* ($\Delta G°' = -14,2$ kJ·mol^{-1}) e *hexocinase* ($\Delta G°' = -16,7$ kJ·mol^{-1}) e devem ser contornadas por meio de *outras* reações catalisadas por enzimas diferentes.

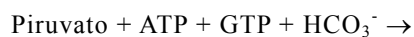
Na gliconeogênese, as três reações irreversíveis são contornadas nas seguintes etapas:

1. Conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato através do oxaloacetato. São necessárias duas reações exergônicas para essa conversão. Na mitocôndria, o piruvato é carboxilado a oxaloacetato (um composto de quatro carbonos intermediário do ciclo do ácido cítrico) as custas de ATP em reação catalisada pela *piruvato–carboxilase*. A coenzima *biotina,* que funciona como transportador de bicarbonato, está covalentemente ligada à enzima através do grupo amino da lisina.

$$\underset{\text{Piruvato}}{\begin{matrix}COO^-\\ |\\ C{=}O\\ |\\ CH_3\end{matrix}} + \underset{\text{Bicarbonato}}{HCO_3^-} \xrightarrow[\text{ATP} \;\to\; \text{ADP+P}_i]{\text{Piruvato-carboxilase}} \underset{\text{Oxaloacetato}}{\begin{matrix}COO^-\\ |\\ C{=}O\\ |\\ CH_2\\ |\\ COO^-\end{matrix}}$$

A piruvato-carboxilase é ativada alostericamente pela acetil–CoA. O oxaloacetato é tanto um precursor para a gliconeogênese quanto um intermediário do ciclo do ácido cítrico. Níveis elevados de acetil–CoA sinalizam a necessidade de mais oxaloacetato. Se houver excesso de ATP, o oxaloacetato será utilizado na gliconeogênese; se houver falta de ATP, o oxaloacetato entrará no ciclo do ácido cítrico.

Como a membrana mitocondrial interna é impermeável ao oxaloacetato esse deve ser transportado para o citosol na forma de *malato.* O oxaloacetato é reduzido a malato na mitocôndria pela malato-desidrogenase.

$$\text{Oxaloacetato + NADH + H}^+ \xleftrightarrow{\text{Malato–desidrogenase}} \text{L-malato + NAD}^+$$

Após a transferência do malato para o citosol por meio do transportador malato–α–cetoglutarato, ocorre reação reversa catalisada por uma malato-desidrogenase citoplasmática.

Em seguida, a descarboxilação do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato é catalisada pela *fosfoenolpiruvato–carboxicinase* presente no citosol, em reação que emprega o GTP como doador do grupo fosforil.

A equação global para as reações de contorno é:

$$\text{Piruvato} + \text{ATP} + \text{GTP} + HCO_3^- \rightarrow \text{fosfoenolpiruvato} + \text{ADP} + \text{GDP} + P_i + CO_2$$

Para produzir uma molécula de fosfoenolpiruvato a partir do piruvato são consumidos dois grupos fosfato de “alta energia” (um do ATP e outro do GTP).

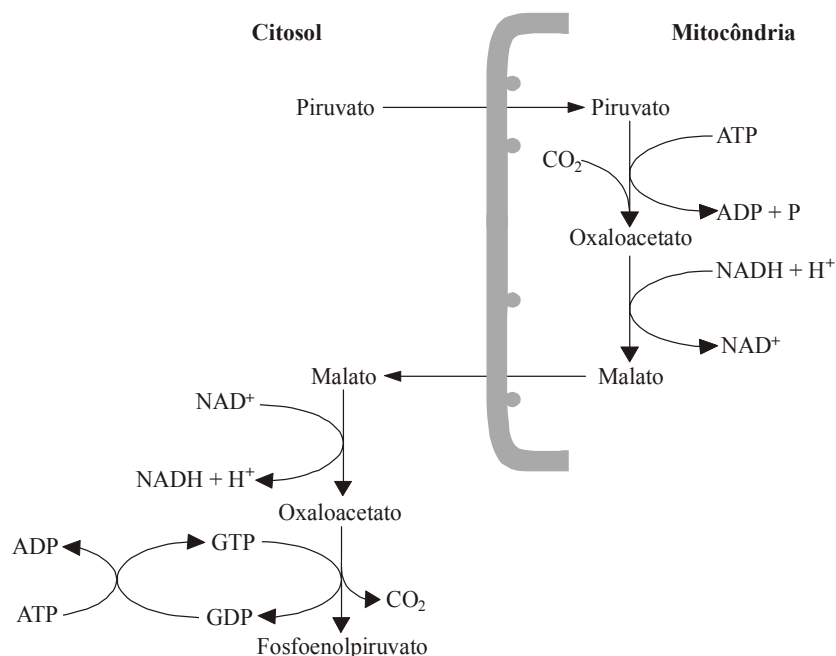
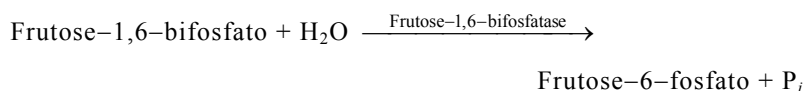



Figura 6.11
Formação do fosfoenolpiruvato a partir do piruvato

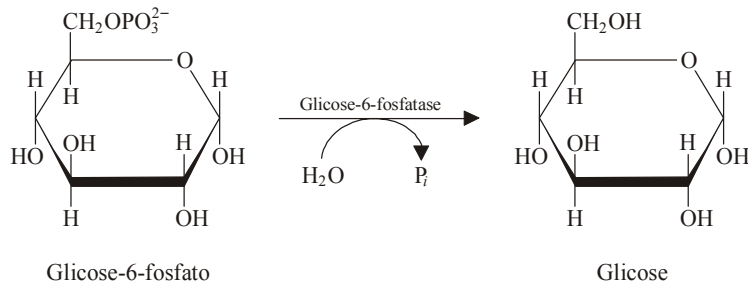
2. Conversão da frutose–1,6–bifosfato a frutose–6–fosfato. A reação irreversível catalisada pela fosfofrutocinase na glicólise é contornada pela *frutose–1,6–bifosfatase* dependente de Mg^{2+}:

$$\text{Frutose–1,6–bifosfato} + H_2O \xrightarrow{\text{Frutose–1,6–bifosfatase}} \text{Frutose–6–fosfato} + P_i$$

A reação é exergônica ($\Delta G°' = -16,3$ kJ·mol^{-1}) e também irreversível em condições celulares. O ATP não é regenerado. A frutose–1,6–bifosfatase é uma enzima alostérica estimulada pelo citrato e inibida pelo AMP e frutose–2,6–bifosfato.

A frutose-6-fosfato é, então, transformada em glicose–6–fosfato pela enzima *glicose–fosfato–isomerase*.

3. Formação de glicose a partir da glicose–6–fosfato. A *glicose–6–fosfatase,* encontrada somente no fígado e rim, catalisa a hidrólise reversível da glicose–6–fosfato para formar glicose e P_i ($\Delta G°' = -13,8$ kJ·mol^{-1}) A glicose é subseqüentemente liberada para o sangue.

$$\text{Glicose-6-fosfato} + H_2O \xrightarrow{\text{Glicose-6-fosfatase}} \text{Glicose} + P_i$$

Glicose-6-fosfato Glicose

A seqüência de fases da gliconeogênese, a partir do fosfoenolpiruvato está resumida na Figura 6.12.

A síntese de glicose a partir de duas moléculas de piruvato requer, no mínimo, seis ATP (nas reações catalisadas por: piruvato−carboxilase, fosfoenolpiruvato−carboxicinase e fosfoglicerato−cinase). Portanto, a gliconeogênese é um processo bastante caro em termos de consumo de energia. Quando a gliconeogênese se processa em altas velocidades, consome mais de 60% do ATP gerado no fígado. Esse ATP é proveniente, principalmente, da oxidação de ácidos graxos. As condições fisiológicas que necessitam a síntese de glicose, geralmente são as mesmas que apresentam disponibilidade de ácidos graxos no sangue. Nessas ocasiões, os ácidos graxos são oxidados na mitocôndria a corpos cetônicos com a conseqüente produção de ATP.

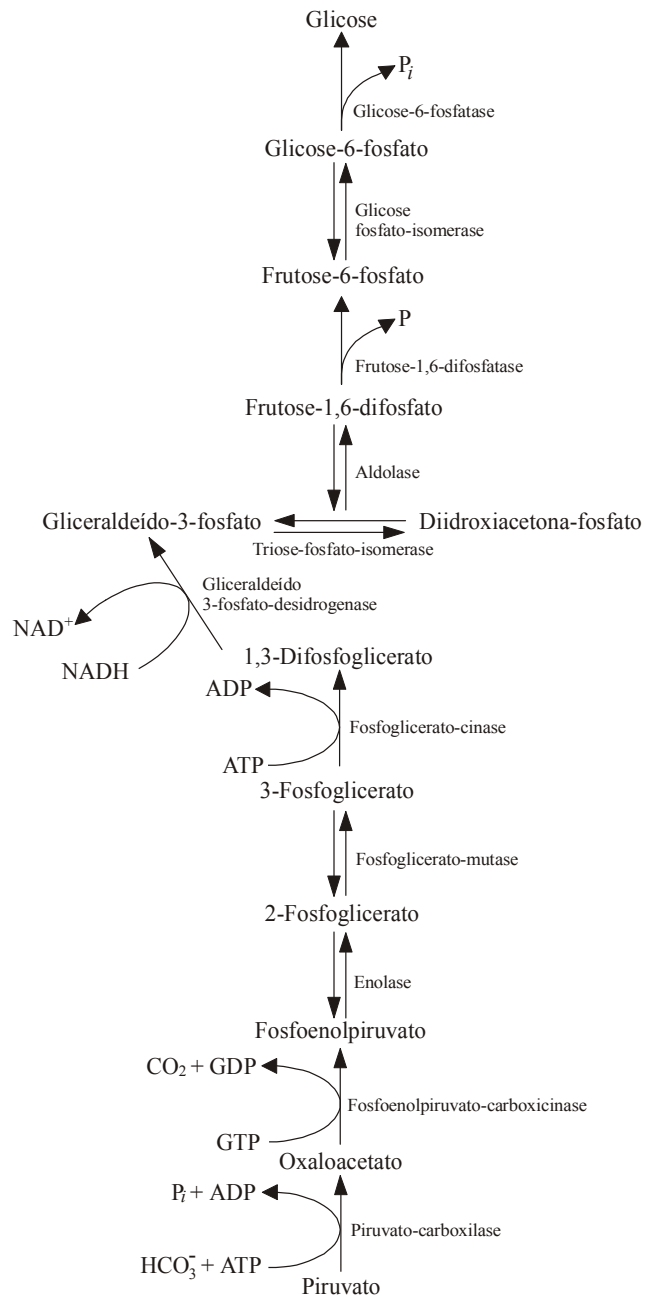



Figura 6.12
Reações da gliconeogênese

B. Precursores para a gliconeogênese

Os precursores não–carboidratos mais importantes para a gliconeogênese são:

1. Lactato. É liberado pelos eritrócitos e outras células sem mitocôndrias e, também, pelos músculos esqueléticos durante alta atividade muscular. É conduzido ao fígado onde é reconvertido a piruvato pela lactato−desidrogenase e, então, em glicose pela gliconeogênese (*Ciclo de Cori*). A glicose resultante difunde para a circulação e é captada pelas células do músculo esquelético para repor os estoques de glicogênio. Desse modo, o ciclo de Cori transfere a energia potencial química na forma de glicose do fígado para os tecidos periféricos.

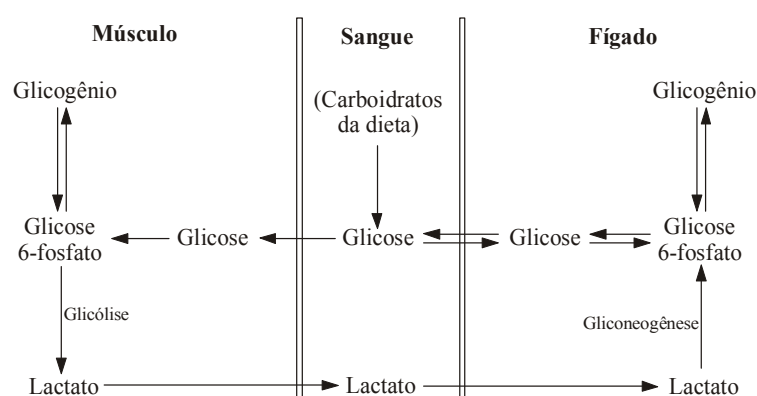
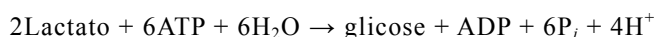



Figura 6.13
Interrelação da glicólise muscular e gliconeogênese hepática (Ciclo de Cori)

A gliconeogênese a partir do lactato é um processo que requer ATP:

$$2\text{Lactato} + 6\text{ATP} + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{glicose} + \text{ADP} + 6\text{P}_i + 4\text{H}^+$$

2. Alanina. É o mais importante aminoácido convertido a intermediários glicolíticos para a gliconeogênese. Durante o jejum prolongado ou inanição, a alanina e outros aminoácidos são liberados a partir de proteínas presentes nos músculos esqueléticos. A alanina é transportada para o fígado, onde sofre transaminação para gerar piruvato. O piruvato por meio da gliconeogênese forma glicose que pode retornar aos músculos ou ser degrada pela via glicolítica. O mecanismo é chamado *ciclo da glicose−alanina* e também transporta o NH_4^+ ao fígado para a síntese da uréia. Os aminoácidos são as principais fontes de carbono para a gliconeogênese durante o jejum, quando os suprimentos de glicogênio estão esgotados.

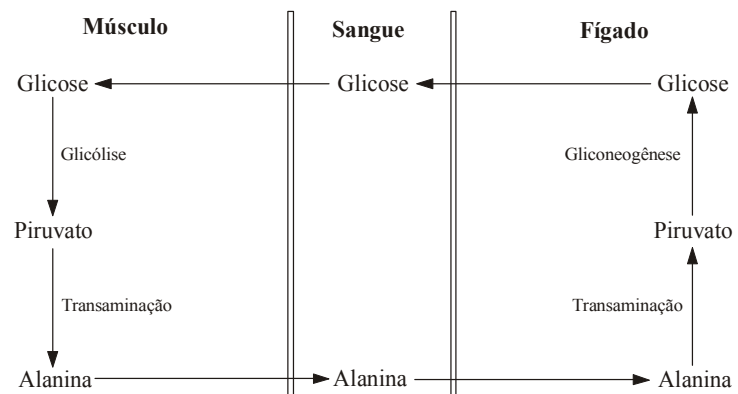



Figura 6.14
Ciclo da glicose alanina

3. Glicerol. É um produto da hidrólise enzimática dos triacilgliceróis no tecido adiposo (*ver* Metabolismo dos lipídeos), é transportado até o fígado pelo sangue e então fosforilado a glicerol−3−fosfato pela glicerol−cinase. O glicerol−3−fosfato participa da gliconeogênese (ou da glicólise) através do intermediário comum, o glicerol−3−fosfato. Por meio do complexo glicerol−3−fosfato−desidrogenase, o glicerol−3−fosfato é transformado em diidroxiacetona−fosfato (DHAP) reação que ocorre quando o teor de NAD^+ citoplasmático está relativamente alto.

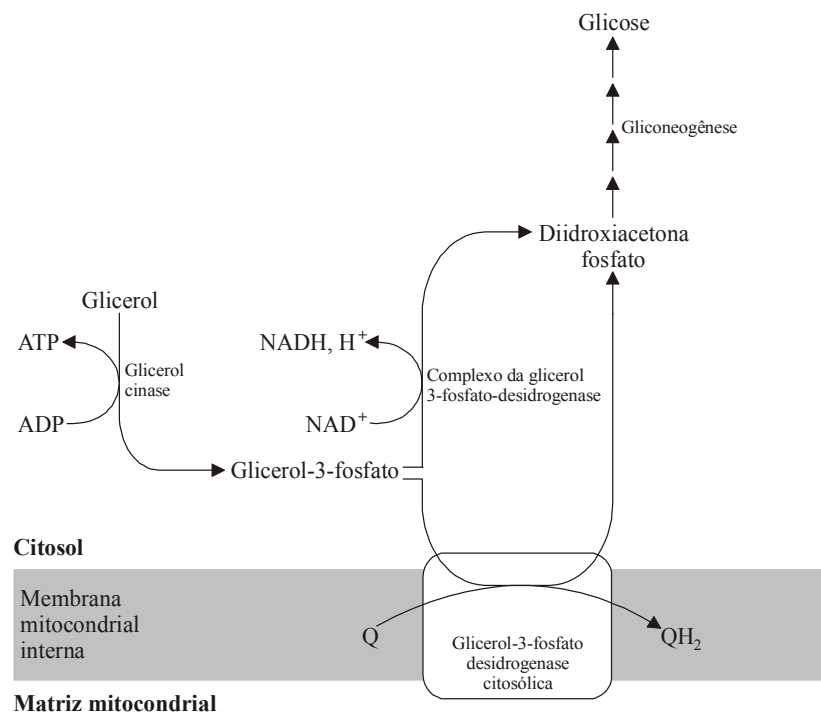



Figura 6.15
Gliconeogênese a partir do glicerol. O Glicerol−3−fosfato é oxidado em reações catalisadas por duas desidrogenases; as duas reações produzem

coenzimas reduzidas. Q = ubiquinona (coenzima Q).

Outros substratos participam em menor grau como fonte para a formação de glicose tais como, os intermediários do ciclo do ácido cítrico e as cadeias carbonadas de vários aminoácidos.

O lactato, o glicerol, a alanina e outros aminoácidos são as fontes de glicose sangüínea durante os estágios intermediários do jejum (1 a 4 dias).

C. Regulação da gliconeogênese

A velocidade da gliconeogênese é afetada principalmente pela disponibilidade de substratos, efetores alostéricos e hormônios. Dietas ricas em gorduras, a inanição e o jejum prolongado elevam as concentrações de lactato, glicerol e aminoácidos e estimulam a gliconeogênese.

As quatro enzimas-chave da gliconeogênese (*piruvato−carboxilase*, *fosfoenolpiruvato−carboxicinase, frutose−1,6−bifosfatase* e *glicose−6−fosfatase*) são afetadas em diferentes graus por moduladores alostéricos. Por exemplo, a frutose−1,6−bifosfatase é ativada pelo ATP e inibida pelo AMP e pela frutose−2,6−bifosfato. A acetil−CoA é um modulador alostérico positivo da piruvato−carboxilase. A concentração da acetil−CoA, um produto da degradação dos ácidos graxos, está elevada durante a inanição.

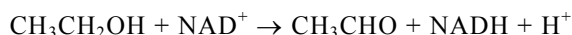
Como em outras vias bioquímicas, os hormônios afetam a gliconeogênese por alterações na concentração dos efetores alostéricos e por modificações na velocidade de síntese das enzimas−chave. O *glucagon* (elevado quando o nível de glicose diminui) reduz a síntese da frutose−2,6−bifosfato, ativando a função fosfatase da PFK−2. A redução do teor da frutose−2,6−bifosfato reduz a ativação da PFK−1 e desinibe a frutose−1,6−bifosfatase.

Outro efeito do glucagon nas células hepáticas é a inativação da enzima glicolítica piruvato−cinase. (A proteína−cinase C, uma enzima ativada pelo AMPc, converte a piruvato−cinase em sua conformação fosforilada inativa). Os hormônios também influenciam a gliconeogênese por alterações na síntese de enzimas. Por exemplo, a síntese de enzimas gliconeogênicas é estimulada pelo cortisol (um hormônio esteróide produzido no córtex da supra-adrenal). A ação da insulina promove a síntese de novas moléculas de glicocinase, PFK−1 e PFK-2. O glucagon promove a síntese de novas moléculas de PEP−carboxicinase, frutose−1,6−bifosfatatase e glicose−6−fosfatase.

O controle hormonal da gliconeogênese é importante no suprimento de ácidos graxos para o fígado além de regular as enzimas, tanto glicolíticas como gliconeogênicas. O glucagon aumenta a concentração dos ácidos graxos no plasma pela lipólise no tecido adiposo, em ação oposta da insulina. A grande disponibilidade de ácidos graxos, estimulada pelo glucagon, resulta em maior oxidação dos ácidos graxos para formar acetil−CoA pelo fígado, permitindo a síntese da glicose. Por outro lado, a insulina tem efeito oposto. O glucagon e a insulina também regulam a gliconeogênese no fígado por influenciar o estado de fosforilação de enzimas hepáticas, tais como, a piruvato−cinase e fosfofrutocinase.

D. Inibição da gliconeogênese pelo etanol

O consumo de álcool (etanol), especialmente por indivíduos subalimentados, pode causar hipoglicemia. Essa condição resulta dos efeitos inibidores do álcool sobre a gliconeogênese hepática causado pelo NADH produzido durante o metabolismo do álcool. O etanol é convertido em acetaldeído (CH_3CHO) pela reação:

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \rightarrow CH_3CHO + NADH + H^+$$

O excesso de NADH no citosol reduz a gliconeogênese, pois desloca o equilíbrio das reações catalisadas pela lactato−desidrogenase e malato−desidrogenase, nas direções de formação do lactato e malato, respectivamente:

$$\text{Piruvato} + NADH + H^+ \rightarrow \text{lactato} + NAD^+$$

Os NADH deveriam ser transportados para a mitocôndria pelo circuito malato−aspartato, mas o fígado não consegue fazê-lo na velocidade suficiente para evitar distúrbios metabólitos. O NADH excedente bloqueia a conversão do lactato a glicose provocando hipoglicemia e também promove a conversão da alanina em lactato, resultando em acúmulo desse último no sangue (acidose láctica).

A substância que ocasiona lesões ao nível do hepatócito, não é o álcool e sim o produto de sua degradação, o *acetaldeído*.

6.6 Via das pentoses-fosfato

A *via das pentoses−fosfato* (ou *desvio hexose−monofosfato* ou *via oxidativa do fosfogliconato*) é uma via metabólica alternativa à glicólise para a oxidação da glicose que não requer e não produz ATP. Seus principais produtos são:

- *NADPH* (nicotinamida adenina dinucleotído fosfato reduzido) um agente redutor empregado para os processos anabólicos.
- *Ribose−5−fosfato* um componente estrutural de nucleotídeos e de ácidos nucléicos.

A via das pentoses-fosfato ocorre no citosol em duas etapas: etapa oxidativa e a etapa não−oxidativa. Na etapa oxidativa a glicose−6−fosfato é convertida à ribulose−5−fosfato (Ru5P) acompanhada pela formação de duas moléculas de NADPH.

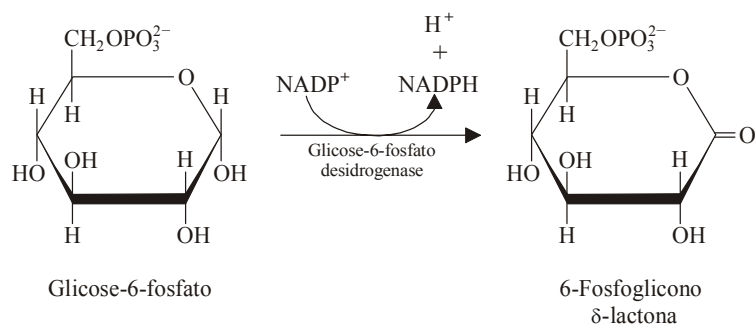
A etapa não−oxidativa envolve a isomerização e condensação de várias moléculas diferentes de açúcar. Três intermediários do processo são utilizados em outras vias: a ribose−5−fosfato, a frutose−6−fosfato e o gliceraldeído−3−fosfato.

A. Reações oxidativas

A etapa oxidativa da via das pentoses-fosfato consiste de três reações. Na primeira reação, a *glicose−6−fosfato−desidrogenase* (G−6−PD) catalisa a oxidação do C1 da glicose−6−fosfato para formar *6−fosfoglicono−δ−lactona* e NADPH:

$NADP^+$ → $NADPH$ + H^+

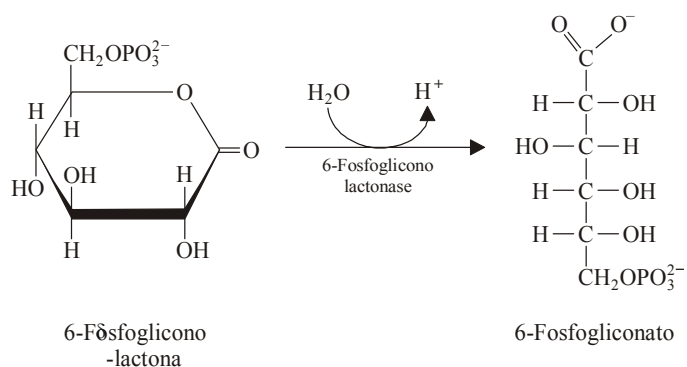
Glicose-6-fosfato desidrogenase

Glicose-6-fosfato → 6-Fosfoglicono δ-lactona

Essa reação é a etapa limitante da via e controla a velocidade de produção de NADPH. A *deficiência glicose−6−fosfato−desidrogenase* nos eritrócitos provoca anemia.

A 6-fosfoglicono−δ−lactona é então hidrolisada para produzir a 6−fosfogliconato por meio da *6−fosfoglicono−lactonase*:

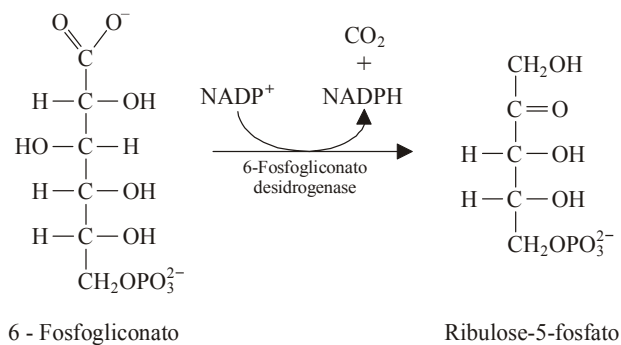
H_2O → H^+

6-Fosfoglicono lactonase

6-Fosfoglicono δ-lactona → 6-Fosfogliconato

O 6−fosfogliconato sofre descarboxilação oxidativa em presença de $NADP^+$ e da *6−fosfogliconato−desidrogenase*, em *ribose−5−fosfato*. São também produzidos CO_2 (proveniente do C1 da hexose) e uma segunda molécula de NADPH:

$NADP^+$ → $NADPH$ + CO_2

6-Fosfogliconato desidrogenase

6 - Fosfogliconato → Ribulose-5-fosfato

Na etapa oxidativa são produzidas duas moléculas de NADPH para cada molécula de glicose−6−fosfato que entra na via.

Quantidades substanciais de NADPH são necessárias para os processos redutores (exemplo, biossíntese dos lipídeos) e mecanismos antioxidantes (exemplo, células com alto riso de lesão oxidativa, como os eritrócitos). As reações são muito ativas em células que sintetizam grande quantidade de lipídeos, tais como, tecido adiposo, córtex adrenal, glândulas mamárias e fígado. A via é pouco ativa no músculo esquelético.

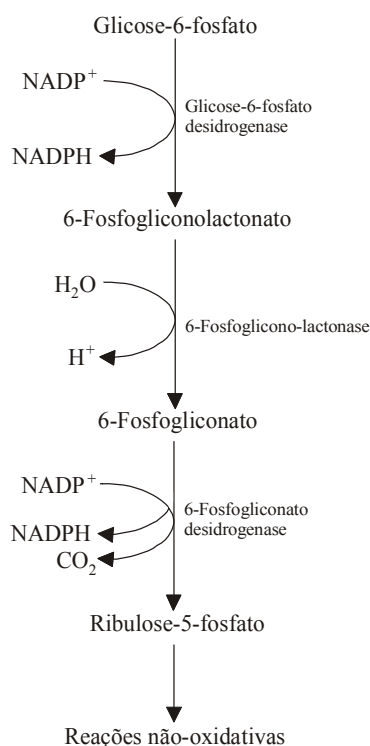
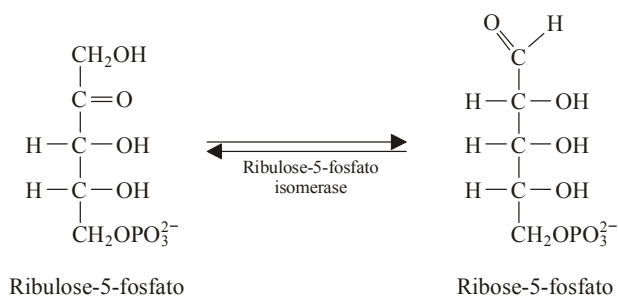



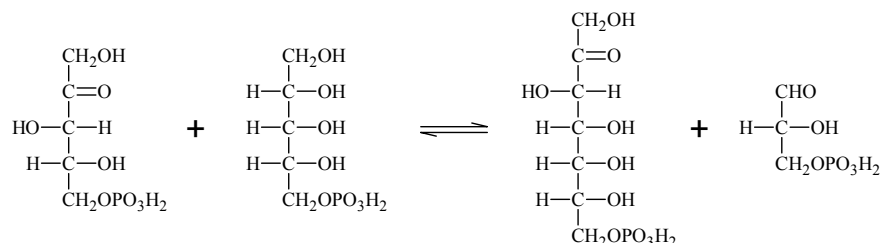
Figura 6.16
Reações oxidativas da via das pentoses-fosfato. Os produtos finais são a D–ribose e o NADPH.

B. Reações da etapa não-oxidativa

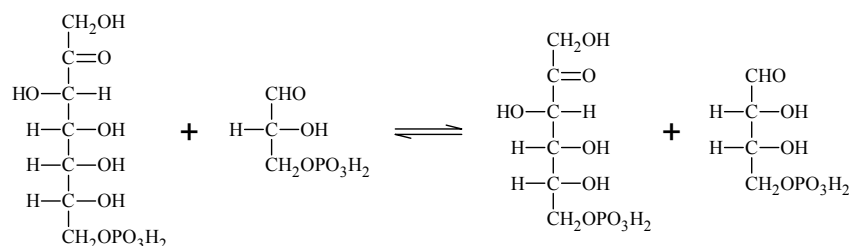
A fase não–oxidativa da via inicia com a conversão da ribulose–5–fosfato à *ribose–5–fosfato* pela *ribulose–5–fosfato–isomerase*:

CH_2OH–C(=O)–(H–C–OH)–(H–C–OH)–$CH_2OPO_3^{2-}$ ⇄ (Ribulose-5-fosfato isomerase) ⇄ O=C(H)–(H–C–OH)–(H–C–OH)–(H–C–OH)–$CH_2OPO_3^{2-}$

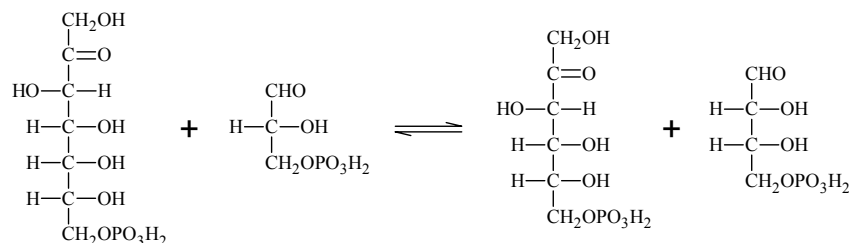
Ribulose-5-fosfato   Ribose-5-fosfato

A ribulose−5−fosfato pode também ser convertida a *xilulose−5−fosfato* pela *ribulose−5−fosfato−epimerase*:

$$
\begin{array}{c}
CH_2OH \\
| \\
C{=}O \\
| \\
HO{-}C{-}H \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
CH_2OPO_3H_2
\end{array}
+
\begin{array}{c}
CH_2OH \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
CH_2OPO_3H_2
\end{array}
\rightleftharpoons
\begin{array}{c}
CH_2OH \\
| \\
C{=}O \\
| \\
HO{-}C{-}H \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
CH_2OPO_3H_2
\end{array}
+
\begin{array}{c}
CHO \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
CH_2OPO_3H_2
\end{array}
$$

Essas interconversões fornecem uma mistura de três pentoses-fosfato (ribulose, xilulose e ribose) cujas concentrações dependem das necessidades da célula.

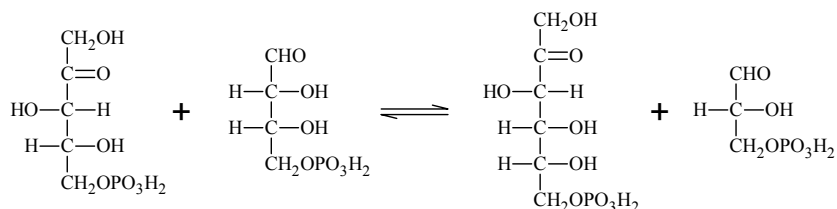
A xilulose−5−fosfato pode reagir com a ribose−5−fosfato para formar *sedoeptulose−7−fosfato* e *gliceraldeído−3−fosfato* pela *translocase*:

$$
\begin{array}{c}
CH_2OH \\
| \\
C{=}O \\
| \\
HO{-}C{-}H \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
CH_2OPO_3H_2
\end{array}
+
\begin{array}{c}
CHO \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
CH_2OPO_3H_2
\end{array}
\rightleftharpoons
\begin{array}{c}
CH_2OH \\
| \\
C{=}O \\
| \\
HO{-}C{-}H \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
CH_2OPO_3H_2
\end{array}
+
\begin{array}{c}
CHO \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
CH_2OPO_3H_2
\end{array}
$$

A ação da *transcetolase* requer o co-fator tiamina pirofosfato (TPP). Envolve a transferência do grupo glicolaldeído da D−xilulose−5−fosfato para o C1 da ribose−5−fosfato. A unidade glicolaldeído está ligada ao complexo enzima−TPP sendo transferido direto para o aceptor. Note que o doador do grupo (xilulose−5−fosfato) e o produto (sedoeptulose−7−fosfato) são cetoses onde o C3 tem configuração "tipo L".

Na reação seguinte, a sedoeptulose−7−fosfato transfere o grupo diidroxiacetona (C1, C2 e C3) para o gliceraldeído−fosfato em reação reversível catalisada pela *transaldolase,* com a formação de *eritrose−4−fosfato* e *frutose−6−fosfato*:

$$
\begin{array}{c}
CH_2OH \\
| \\
C{=}O \\
| \\
HO{-}C{-}H \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
CH_2OPO_3H_2
\end{array}
+
\begin{array}{c}
CHO \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
CH_2OPO_3H_2
\end{array}
\rightleftharpoons
\begin{array}{c}
CH_2OH \\
| \\
C{=}O \\
| \\
HO{-}C{-}H \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
CH_2OPO_3H_2
\end{array}
+
\begin{array}{c}
CHO \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
H{-}C{-}OH \\
| \\
CH_2OPO_3H_2
\end{array}
$$

A transaldolase difere da aldolase da via glicolítica por não liberar a diidroxiacetona livre; essa última está ligada a enzima transaldolase e é transferida diretamente ao aceptor.

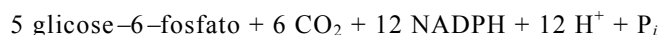
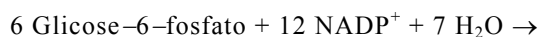
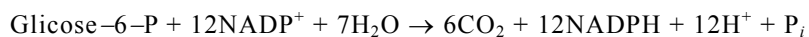
A eritrose–4–fosfato atua como aceptor na reação da transcetolase. Ela pode então reagir com a xilulose–5–fosfato para fornecer frutose–6–fosfato e gliceraldeído–3–fosfato:

CH_2OH | C=O | HO—C—H | H—C—OH | $CH_2OPO_3H_2$ **+** CHO | H—C—OH | H—C—OH | $CH_2OPO_3H_2$ $\rightleftharpoons$ CH_2OH | C=O | HO—C—H | H—C—OH | H—C—OH | $CH_2OPO_3H_2$ **+** CHO | H—C—OH | $CH_2OPO_3H_2$

As reações acima mostram que o resultado líquido da via das pentoses-fosfato é a produção de frutose–6–fosfato e gliceraldeído–3–fosfato. Quando as pentoses não são necessárias para reações de biossíntese, os metabólitos da etapa não–oxidativa podem ser consumidos pela glicólise. Com a cooperação de quatro enzimas glicolíticas, essa via pode resultar na conversão de todos os carbonos da glicose em CO_2. As enzimas necessárias são: (1) *triose–fosfato–isomerase* para converter o gliceraldeído–3–fosfato a diidroxiacetona fosfato; (2) *aldolase* para produzir frutose-1,6-bifosfato a partir do gliceraldeído–3–fosfato e diidroxiacetona–fosfato; (3) *frutose–1,6–bifosfatase* para hidrolisar a frutose–1,6–bifosfato a frutose–6–fosfato; (4) *glicose–fosfato–isomerase* para formar glicose–6–fosfato a partir da frutose–6–fosfato. A glicose–6–fosfato pode re–entrar na via e repetir o processo. A equação geral da via pentoses–fosfato é:

$$\text{6 Glicose–6–fosfato} + 12\ NADP^+ + 7\ H_2O \rightarrow$$

$$\text{5 glicose–6–fosfato} + 6\ CO_2 + 12\ NADPH + 12\ H^+ + P_i$$

A reação líquida é

$$\text{Glicose–6–P} + 12NADP^+ + 7H_2O \rightarrow 6CO_2 + 12NADPH + 12H^+ + P_i$$

De acordo com as considerações acima, 6 mol de glicose–6–fosfato são convertidos em 6 moles de CO_2 e 5 moles de glicose–6–fosfato. Esse último, pela adição de outro mol de glicose–6–fosfato, pode ser reciclado através das mesmas etapas. A Figura 5.24 mostra o esquema do processo geral.

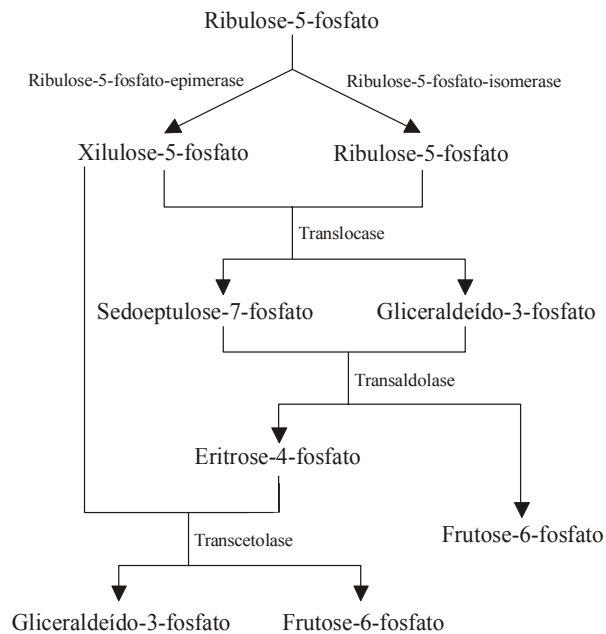



Figura 6.17
Reações não-oxidativas da via pentoses–fosfato.

Alternativamente, a via das pentoses–fosfato pode ser concebida como um “desvio” para a produção de frutose–6–fosfato a partir da glicose–6–fosfato. Tanto a glicose–6–fosfato como o gliceraldeído–3–fosfato produzidos pela via das pentoses–fosfato podem ser metabolizados a piruvato e, finalmente, oxidado no sistema enzimático mitocondrial.

6.7 Visão geral do metabolismo da glicose em várias células

O metabolismo da glicose em diversos tecidos ocorre do seguinte modo:

- *Eritrócitos.* Glicólise (lactato como produto final) e via das pentoses–fosfato.
- *Cérebro.* Glicólise (piruvato como produto final), ciclo do ácido cítrico e via das pentoses–fosfato.
- *Células musculares.* Glicólise (piruvato e lactato como produto final), ciclo do ácido cítrico, via das pentoses–fosfato, glicogênese e glicogenólise.
- *Tecido adiposo.* Glicólise, ciclo do ácido cítrico, via das pentoses–fosfato, glicogênese, glicogenólise e lipogênese,.

Quadro 6.4 Defeitos no metabolismo da frutose

São conhecidos três defeitos hereditários do metabolismo da frutose. A *frutosúria essencial* é uma desordem metabólica benigna causada pela deficiência de *frutocinase* que está normalmente presente no fígado, ilhotas do pâncreas e no córtex renal. Os sintomas são: aumento no teor de frutose no sangue e aparecimento de frutosúria após ingestão de frutose; mesmo assim, 80 a 90% da frutose é metabolizada e pode permanecer sem diagnóstico.

Outro defeito mais sério, é a *intolerância hereditária à frutose*, que consiste de deficiência da *frutose-1-fosfato aldolase* (também chamada aldolase do Tipo B), provocando hipoglicemia severa após a ingestão de frutose. Em crianças o consumo prolongado de frutose pode levar a uma condição crônica ou morte.

Nessa desordem, a frutose 1-fosfato acumula intracelularmente no fígado e rins, resultando em lesão renal com distúrbios funcionais. utros sintomas são: dor abdominal e vômitos. O tratamento consiste na remoção de frutose e sacarose da dieta. A hipoglicemia presente nesse distúrbios é provocada pela inibição da glicogenólise por interferência com a glicogênio-fosforilase pela frutose 1-fosfato.A *deficiência hereditária da frutose-1,6-bifosfatase* resulta em severa redução da gliconeogênese hepática, provocando episódios de hipoglicemia, apnéia, hiperventilação, cetose e acidose láctica. Em neonatos, a deficiência pode ser letal. Em outras idades os episódios podem ser desencadeados pelo jejum e infecções febris.

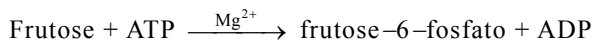
- *Fígado.* Glicólise, ciclo do ácido cítrico, glicogênese, glicogenólise, via das pentoses–fosfato, gliconeogênese, liberação de glicose para o sangue e formação de glicuronídeos (excreção de fármacos e bilirrubina),

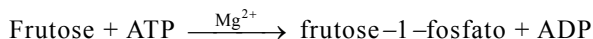
6.8 Metabolismo de outros monossacarídeos importantes

Os monossacarídeos frutose, galactose e manose encontrados comumente em oligossacarídeos e polissacarídeos, exercem importante papel como combustíveis metabólicos. São convertidos em intermediários glicolíticos.

A. Metabolismo da frutose

As fontes de frutose na dieta incluem frutas, mel e o dissacarídeo sacarose. A frutose pode entrar na via glicolítica por duas vias: (1) no músculo e tecido adiposo, a frutose é fosforilada no C6 para produzir frutose-6-fosfato pela ação da *hexocinase* em conversão semelhante a da glicose em glicose–6–fosfato. A frutose–6–fosfato formada entra na via glicolítica.

$$\text{Frutose + ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{frutose–6–fosfato + ADP}$$

(2) a enzima *frutocinase.*catalisa a fosforilação da frutose em C1:

$$\text{Frutose + ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{frutose–1–fosfato + ADP}$$

A frutose–1–fosfato entra na glicólise e é clivada pela *frutose–1–fosfato–aldolase* (também chamada aldolase do Tipo B) em diidroxiacetona–fosfato (DHAP) e gliceraldeído. A DHAP é, então, convertida a gliceraldeído–3–fosfato pela *triose–fosfato–isomerase.*

Quadro 6.4 Galactosemia

A ausência hereditária da enzima *galactose-1-fosfato-uridiltransferase* resulta na *galactosemia.* Os indivíduos portadores desse defeito são inacapazes de metabolizar galactose derivada do leite (lactose) nos metabólitos de glicose, muitas vezes resultando na formação de cataratas, hepatomegalia e retardamento mental. O tratamento consiste em dieta isenta de lactose. A dieta deve ser realizada durante a infância para evitar sérias lesões irreversíveis..

Outro defeito mais sério, é a *intolerância hereditária à frutose*, que consiste de deficiência da *frutose-1-fosfato aldolase* (também chamada aldolase do Tipo B), provocando hipoglicemia severa após a ingestão de frutose. Em crianças o consumo prolongado de frutose pode levar a uma condição crônica ou morte.

Outra forma de galactosemia mais moderada envolve a ausência da enzima galactocinase, que leva ao acímulo de galactose nos tecidos e a excreção urinária desse açúcar. O excesso de galactose em tecidos é convertido a galactitol (dulcitol), que leva a formação de catarata. O tratamento é o mesmo descrito acima.

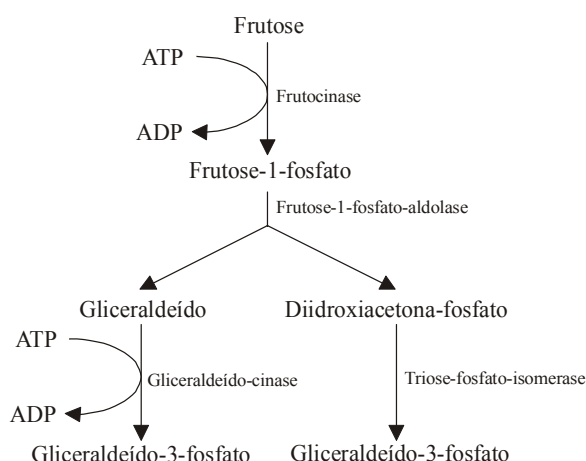



Figura 6.18
Metabolismo da frutose

O gliceraldeído é também fosforilado pelo ATP em reação catalisada pela *gliceraldeído−cinase* para formar gliceraldeído-3-fosfato.

Assim, os dois produtos da hidrólise da frutose entram na glicólise como gliceraldeído−3−fosfato.

B. Metabolismo da galactose

Apesar da galactose e da glicose apresentarem estruturas similares (são epímeros que diferem na configuração no C4) várias reações são necessárias para que esse açúcar entre na via glicolítica. A galactose é inicialmente convertida à galactose-1-fosfato pela *galactocinase.* A seguir, a galactose-1-fosfato é transformada em um derivado uridina−fosfato, a UDP−galactose. Durante o

desenvolvimento fetal e na infância a formação da UDP–galactose é catalisada pela *galactose–1–fosfato–uridiltransferase*. Na adolescência, a UDP–galactose é produzida pela ação da *UDP–galactose–pirofosforilase*.

A UDP–galactose é transformada por isomerização em UDP-glicose pela ação da *UDP-glicose–4–epimerase*. Dependendo das necessidades metabólicas da célula, a UDP-glicose é usada diretamente na síntese do glicogênio ou é convertida à glicose 1-fosfato pela *UDP–glicose–pirofosforilase*. A glicose 1–fosfato entra na via glicolítica após sua conversão a glicose–6–fosfato pela *fosfoglicomutase* (Figura 6.18).

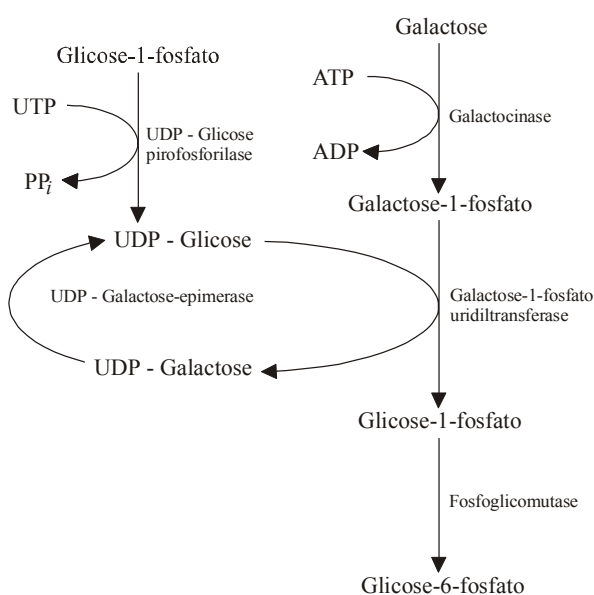



Figura 6.19
Metabolismo da galactose.

C. Metabolismo da manose

A manose é um importante componente dos oligossacarídeos encontrados nas glicoproteínas. A manose é fosforilada pela hexocinase à manose–6–fosfato que, a seguir, é transformada pela *fosfomanose–isomerase* em frutose–6–fosfato que entra na via glicolítica.

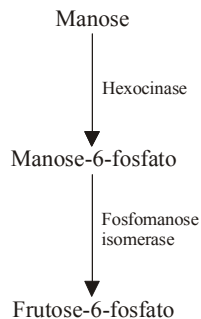



Figura 6.20
Metabolismo da manose.

Resumo

1. O metabolismo dos carboidratos está centrado na glicose porque esse açúcar é uma molécula combustível importante para a maioria dos organismos. Se as reservas de energia são baixas, a glicose é degradada pela via glicolítica. As moléculas de glicose não utilizadas para a produção imediata de energia são armazenadas como glicogênio (em animais) ou amido (em vegetais).

2. Durante a glicólise (seqüência de 10 reações), a glicose é fosforilada e clivada para formar duas moléculas de gliceraldeído–3–fosfato. Cada gliceraldeído–3–fosfato é então convertido em uma molécula de piruvato. Uma pequena quantidade de energia é armazenada em moléculas de ATP e NADH. Em organismos anaeróbicos, o piruvato é reduzido a lactato. Durante esse processo, o NAD^+ é regenerado para a continuação da glicólise. Na presença de O_2, os organismos aeróbicos convertem o piruvato a acetil–CoA e, então, a CO_2 e H_2O. A glicólise é controlada principalmente por regulação alostérica de três enzimas – hexocinase, fosfofrutocinase 1 (PFK–1) e piruvato–cinase e pelos hormônios insulina e glucagon.

3. Durante a gliconeogênese, moléculas de glicose são sintetizadas a partir de precursores não–carboidratos (lactato, piruvato, glicerol e certos aminoácidos). A seqüência de reações na gliconeogênese corresponde a reações da via glicolítica, mas no sentido inverso. As três reações irreversíveis da glicólise (síntese do piruvato, conversão da frutose–1,6–bifosfato a frutose–6–fosfato e a formação de glicose a partir da glicose–6–fosfato) são substituídas na gliconeogênese por reações energeticamente favoráveis.

4. A via das pentoses-fosfato, na qual a glicose-6-fosfato é oxidada, ocorre em duas etapas. Na etapa oxidativa, duas moléculas de NADPH são produzidas enquanto a glicose–6–fosfato é convertida em ribulose–5–fosfato. Na etapa não–oxidativa, a ribose–5–fosfato e outros açúcares são sintetizados. Se a célula necessita mais NADPH que ribose–5–fosfato (componente dos nucleotídeos e ácidos nucléicos) então os metabólitos da etapa não–oxidativa são convertidos em intermediários glicolíticos.

5. Vários açúcares diferentes da glicose são importantes no metabolismo dos vertebrados. Entre eles estão: frutose, galactose e a manose.

6. O substrato para a síntese de glicogênio é a UDP−glicose, uma forma ativada do açúcar. A UDP−glicose−pirofosforilase catalisa a formação de UDP−glicose a partir da glicose−1−fosfato e UTP. A glicose−6−fosfato é convertida em glicose−1−fosfato pela fosfoglicomutase. Para formar o glicogênio são necessários duas enzimas: a glicogênio sintase e a enzima de ramificação. A degradação do glicogênio requer a glicogênio-fosforilase e a enzima de desramificação. O equilíbrio entre glicogênese (síntese do glicogênio) e glicogenólise (clivagem do glicogênio) é regulada por vários hormônios (insulina, glucagon e adrenalina).

Referências

BLACKSTOCK, J. C, **Biochemistry.** Oxford: Butterworth, 1998. p. 164-91.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger: Princípios de bioquímica.** 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 269-96.

STRYER, L. **Bioquímica.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. p. 419-36.

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica.** Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 353-81.

Capítulo

7

VALTER T. MOTTA

BIOQUÍMICA BÁSICA

Ciclo do Ácido Cítrico

7

Ciclo do Ácido Cítrico

Objetivos

1. Descrever a obtenção de acetil–CoA pela descarboxilação oxidativa do piruvato nas mitocôndrias.
2. Reconhecer que o ciclo do ácido cítrico é a via de oxidação do grupo acetila da acetil–CoA com formação de três NADH e de um $FADH_2$ além da formação de um ATP (ou GTP) por fosforilação ao nível do substrato.
3. Identificar a reação catalisada pela citrato–sintase como a primeira reação do ciclo do ácido cítrico e reconhecer as substâncias participantes.
4. Identificar as substâncias participantes das reações do ciclo do ácido cítrico catalisadas por: isocitrato–desidrogenase, complexo do α–cetoglutarato, succinil–CoA–sintetase (succinato–tiocinase), succinato desidrogenase e malato–desidrogenase.
5. Explicar a reação catalisada succinil–CoA–sintetase (succinato tiocinase) na formação de ATP ao nível do substrato.
6. Calcular o número de compostos de "alta energia" (ATP) sintetizados pela oxidação de um mol acetil–CoA no ciclo do ácido cítrico.
7. Descrever os mecanismos de regulação do ciclo do ácido cítrico.
8. Descrever a entrada e saída de intermediários do ciclo do ácido cítrico.

O ciclo do ácido cítrico (também chamado de *ciclo de Krebs* ou *ciclo dos ácidos tricarboxílicos*) é o estágio final da oxidação dos combustíveis metabólicos. Os átomos de carbono entram no ciclo na forma de grupos acetila derivados dos carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos. O grupo acetila ligado a coenzima A (acetil-CoA) é oxidado em oito reações mitocondriais para formar duas moléculas de CO_2 com a conservação da energia livre liberada em três moléculas de NADH, uma de $FADH_2$ e um composto de "alta energia" (GTP ou ATP). O NADH e o $FADH_2$ são oxidados e os elétrons são conduzidos pela *cadeia mitocondrial transportadora de elétrons* com a liberação de energia conservada na forma de ATP sintetizado a partir de ADP e P_i por meio de processo denominado *fosforilação oxidativa* (*ver* Capítulo 8). A reação líquida para o ciclo do ácido cítrico é:

Quadro 7.1 Descoberta do ciclo do ácido cítrico

A operação do ciclo do ácido cítrico foi deduzida por *Hans Krebs* em 1937 a partir de observações sobre a velocidade de consumo de oxigênio durante a oxidação do piruvato por suspensões de músculos peitorais de pombos. Esses músculos ativos no vôo, exibem uma velocidade de respiração muito alta e são apropriados para as investigações metabólicas. O consumo de oxigênio foi monitorado com o auxílio de um manômetro, um aparelho que permite a medida das alterações no volume de um sistema fechado a pressão e temperatura constantes.

Estudos anteriores, principalmente os realizados por *Albert Szent–Györgyi* (1935), mostraram que o succinato, o fumarato, o malato e o oxaloacetato estimulavam o consumo de oxigênio por esses músculos. Krebs mostrou que o piruvato também aumentava o consumo de oxigênio.

Além disso, ele também observou que a oxidação do piruvato podia ser grandemente estimulada pelo oxaloacetato, *cis*-aconitato, isocitrato e α-cetoglutarato. Os efeitos dessas substâncias eram completamente suprimidos pela adição de *malonato,* um inibidor competitivo da succinato–desidrogenase. A adição do malonato também acumulava citrato, α–cetoglutarato e succinato. Pelo fato da adição do piruvato e oxaloacetato à suspensão ter resultado no acúmulo de citrato, Krebs concluiu que a via operava como um ciclo. Somente em 1951 foi demonstrado que a acetil-CoA é o intermediário que condensa com o oxaloacetato para formar citrato.

Krebs publicou sua descoberta no periódico *Enzimologia* já que a revista *Nature* recusou o artigo original.

$$\text{Acetil–CoA} + 3\ NAD^+ + FAD + GDP + P_i + 2\ H_2O \rightarrow$$
$$2\ CO_2 + 3\ NADH + FADH_2 + CoASH + GTP + 3\ H^+$$

Além do papel na geração de energia, o ciclo do ácido cítrico também é fonte de unidades monoméricas para a biossíntese de carboidratos, lipídeos e aminoácidos não-essenciais.

Nesse contexto será examinado como o piruvato, derivado da glicose e outros açúcares através da via glicolítica, é oxidado à acetil–CoA e CO_2 para entrar no ciclo do ácido cítrico (Figura 7.1).

O piruvato atravessa a membrana externa da mitocôndria via canais aquosos de proteínas transmembranas chamados porinas (*ver* Seção 9.4). A piruvato–translocase, uma proteína da membrana mitocondrial interna, transporta especificamente o piruvato do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial em simporte com o H^+ (*ver* Seção 9.4.B).

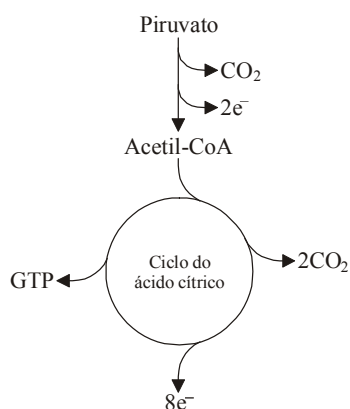
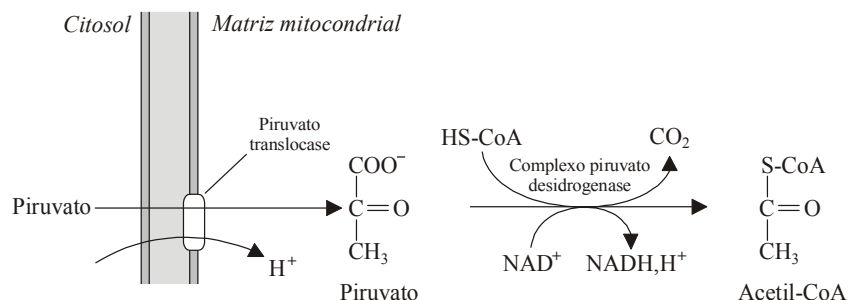



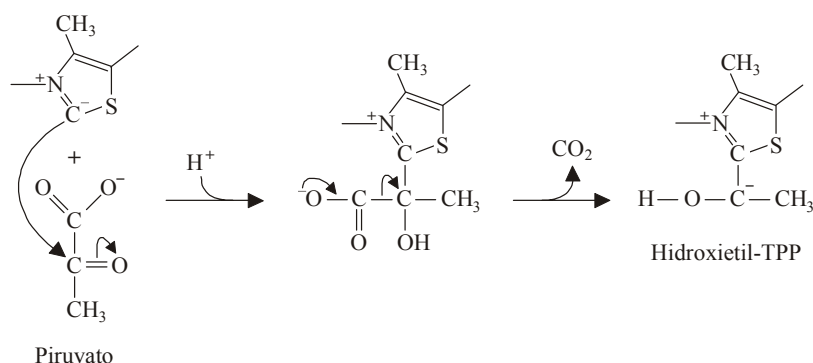
Figura 7.1
Associação da glicólise e o ciclo do ácido cítrico. O piruvato produzido na glicólise é convertido em acetil–CoA, o combustível do ciclo do ácido cítrico. Os elétrons removidos são transportados pelo NADH e $FADH_2$ para a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons no interior das mitocôndrias

que fornece energia para a síntese de ATP.

7.1 Oxidação do piruvato a acetil–CoA e CO_2

Sob condições aeróbicas, o piruvato presente na matriz mitocondrial é convertido em CO_2 e um fragmento de dois carbonos, a acetil–CoA em reação de descarboxilação oxidativa. A reação é catalisada pelo *complexo da piruvato–desidrogenase* constituído por três enzimas distintas: a *piruvato–desidrogenase* (E1), a *diidrolipoil–transacetilase* (E2) e a *diidrolipoi–desidrogenase* (E3) associadas de modo não-covalente e cinco diferentes coenzimas. O complexo está localizado exclusivamente na mitocôndria das células eucarióticas. Devido a grande energia livre padrão negativa dessa reação sob condições fisiológicas, o processo é irreversível o que impede a reação inversa de formação do piruvato a partir do acetil–CoA.

A operação do complexo da piruvato desidrogenase requer cinco coenzimas cujos papéis funcionais são descritos a seguir.

1. Descarboxilação oxidativa do piruvato. A reação requer o co-fator *pirofosfato de tiamina* (TPP) ligado à enzima *piruvato–desidrogenase* (E1). O TPP ataca o carbono da carbonila do piruvato e libera o CO_2 deixando o grupo hidroxietil ligado ao TPP para formar o hidroxietil–TPP (HETTP).

Piruvato

Hidroxietil-TPP

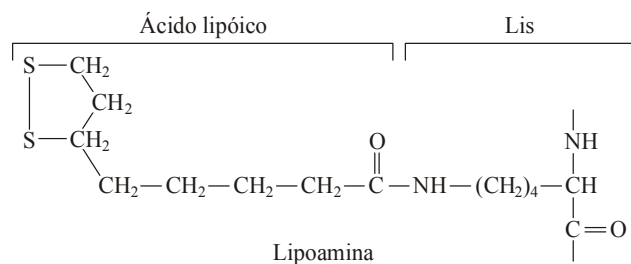
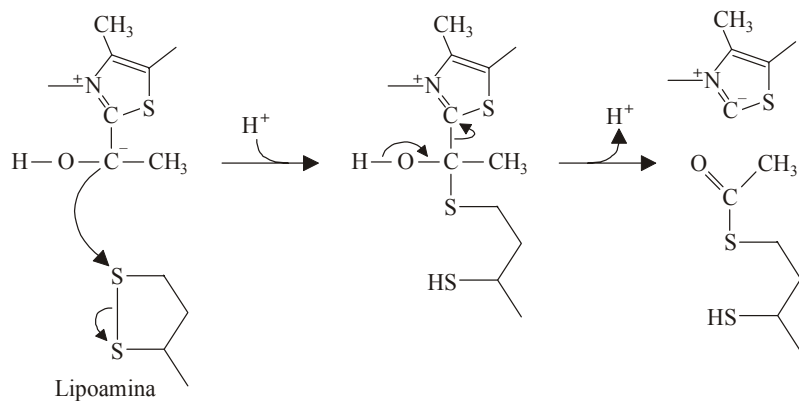
2. Transferência do grupo hidroxietil do HETTP para a *diidrolipoil–transacetilase* (E2). O aceptor do hidroxietil é o

grupo prostético *lipoamida*. A reação de transferência regenera o TPP da E1 e oxida o grupo hidroetil a um grupo acetila.

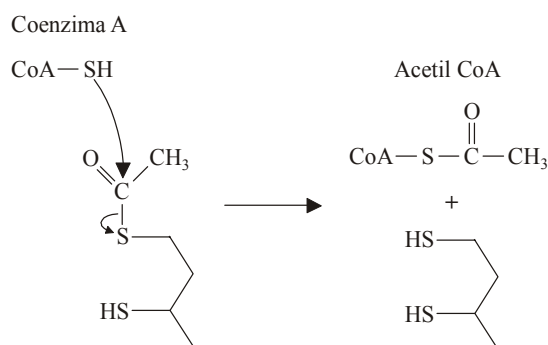
Lipoamina

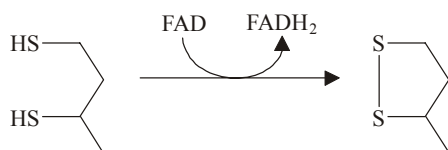
Ácido lipóico

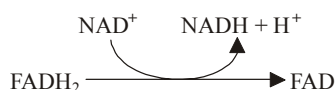
Lis

Lipoamina

3. Transferência do grupo acetila para a *coenzima A,* em reação catalisada pela *diidrolipoil–transacetilase*.

Coenzima A

Acetil CoA

4. Regeneração do complexo da piruvato–desidrogenase original. O grupo diidrolipoato da E2 é reduzido pela flavina adenina dinuclotídeo (FAD) em presença de *diidrolipoil–desidrogenase* com a regeneração do lipoato.

$$\text{HS}, \text{HS} \xrightarrow{\text{FAD} \rightarrow \text{FADH}_2} \text{S–S}$$

5. A $FADH_2$ é reoxidada pela transferência dos elétrons para o NAD^+ para formar NADH. O NADH transfere os elétrons para a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons que está acoplada à síntese de 2,5 moléculas de ATP por meio da fosforilação oxidativa. A reação total de conversão de piruvato a acetil–CoA é altamente exergônica $\Delta G°' = -33{,}5\ \text{kJ·mol}^{-1}$. Como para cada molécula de glicose, 2 piruvato são formados pela glicólise, são sintetizadas 5 moléculas de ATP.

$$\text{FADH}_2 \xrightarrow{\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+} \text{FAD}$$

A representação esquemática da operação do complexo da piruvato−desidrogenase está resumida na Figura 7.2.

A atividade do complexo da piruvato−desidrogenase é regulada por mecanismos alostéricos e covalentes. O complexo é ativado e inibido alostericamente pelos efetores mostrados no Quadro 7.1.

Quadro 7.1 – Principais efetores alostéricos do complexo da piruvato−desidrogenase.

Efetores positivos (ativadores)	Efetores negativos (inibidores)
Coenzima A	ATP
NAD^+	NADH
AMP	Acetil−CoA
Ca^{2+}	Ácidos graxos de cadeia longa

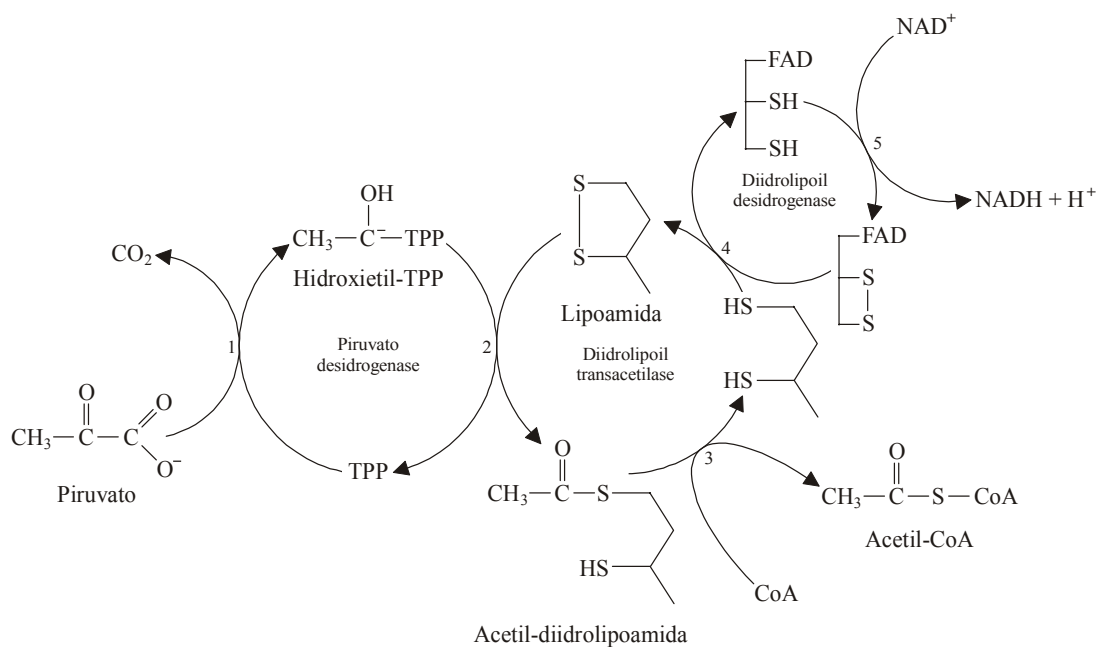



Figura 7.2
Operação do complexo da piruvato-desidrogenase. TTP = pirofosfato de tiamina. O lipoato tem dois grupos tiós (–SH) que formam uma ligação dissulfeto (–S–S–) por oxidação.

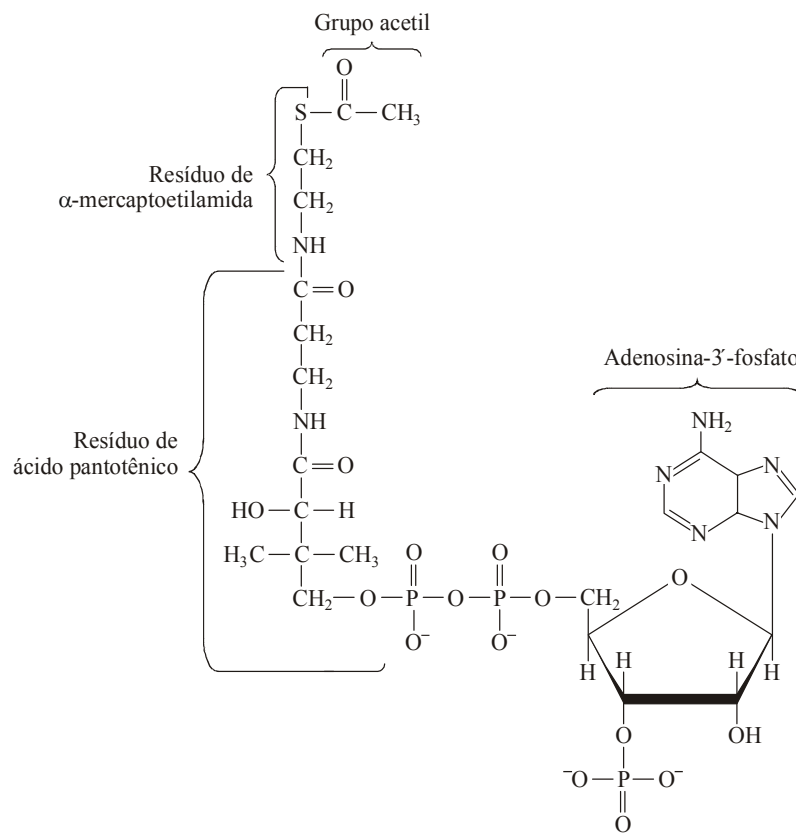
Os mecanismos de regulação alostérica do complexo são complementados por modificações covalentes de proteínas. O complexo é inibido por fosforilação pela ação de proteína-cinase (altos teores de piruvato, CoASH e NAD^+ inibem a cinase) e ativado por desfosforilação pela ação de fosfatases quando os níveis de [ATP] mitocondrial declinam.

A seguir a fórmula d coenzima A (CoA):

Grupo acetil

Resíduo de α-mercaptoetilamida

Resíduo de ácido pantotênico

Adenosina-3′-fosfato

Acetil-coenzima A (acetil-CoA)

A. Destinos metabólicos do acetil-CoA

Os principais destinos metabólicos do acetil–CoA produzido na mitocôndria incluem: (1) completa oxidação do grupo acetila no ciclo do ácido cítrico para a geração de energia; (2) conversão do excesso de acetil–CoA em corpos cetônicos (acetoacetato, β–hidroxibutirato e acetona) no fígado; (3) transferência de unidades acetila para o citosol com a subseqüente biossíntese de moléculas complexas como os esteróis e ácidos graxos de cadeia longa.

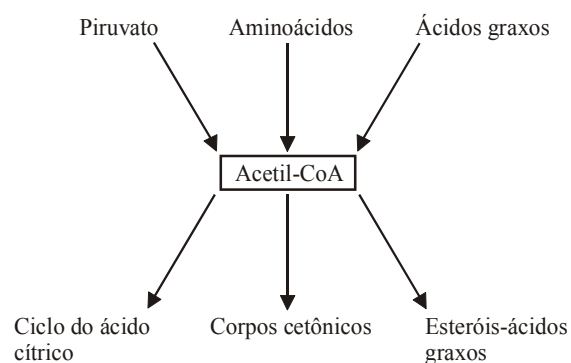



Figura 7.3
Destinos do acetil-CoA

7.2 Reações do ciclo do ácido cítrico

A oxidação de acetil–CoA é realizada pelo ciclo do ácido cítrico em oito reações sucessivas onde entra o grupo acetila (dois carbonos) e saem duas moléculas de CO_2. (Figura 7.4).

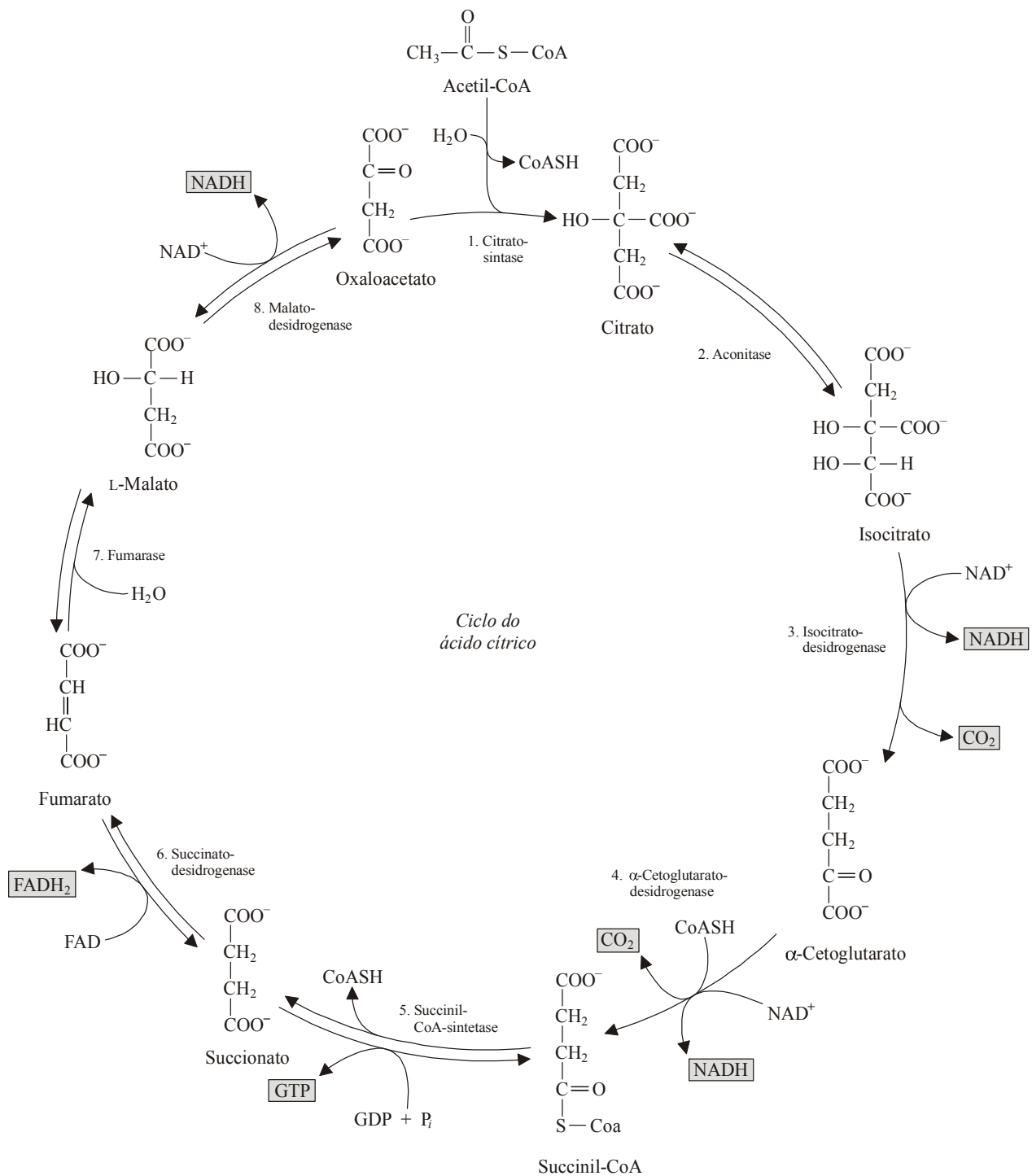
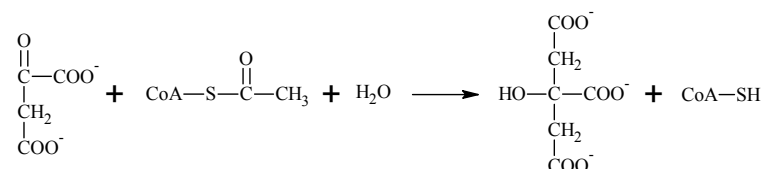



Figura 7.4
Reações do ciclo do ácido cítrico. O ciclo oxida duas unidades de carbono com a produção de duas moléculas de CO_2, uma molécula de GTP, três moléculas de NADH e uma molécula de $FADH_2$.

1. Condensação da acetil-CoA com o oxaloacetato. A etapa inicial do ciclo do ácido cítrico é a condensação do acetil–CoA com o

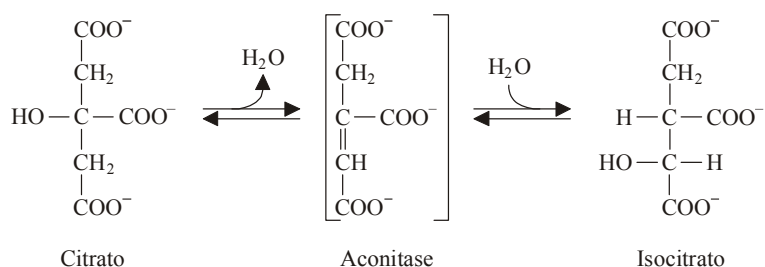
oxalacetato para formar *citrato* e *CoA* livre, em reação irreversível catalisada pela *citrato–sintase.* A condensação aldólica ocorre entre o grupo metílico da acetil–CoA e o grupo carboxílico do oxaloacetato, com hidrólise da ligação tioéster e a produção de coenzima A livre. A reação é altamente exergônica ($\Delta G°' = -31{,}5\ kJ \cdot mol^{-1}$).

$$\begin{array}{l} O \\ \| \\ C{-}COO^- \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COO^- \end{array} + CoA{-}S{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}CH_3 + H_2O \longrightarrow HO{-}\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ CH_2 \\ | \\ C \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COO^- \end{array}{-}COO^- + CoA{-}SH$$

A citrato-sintase é inibida pelo ATP, NADH, succinil–CoA e ésteres acil–CoA graxos. A velocidade de reação é determinada pela disponibilidade de acetil–CoA e do oxaloacetato. O citrato também está envolvido na regulação de outras vias metabólicas (inibe a *fosfofrutocinase* na glicólise e ativa a *acetil–CoA–carboxilase* na síntese dos ácidos graxos) e como fonte de carbono e equivalentes redutores para vários processos de síntese.

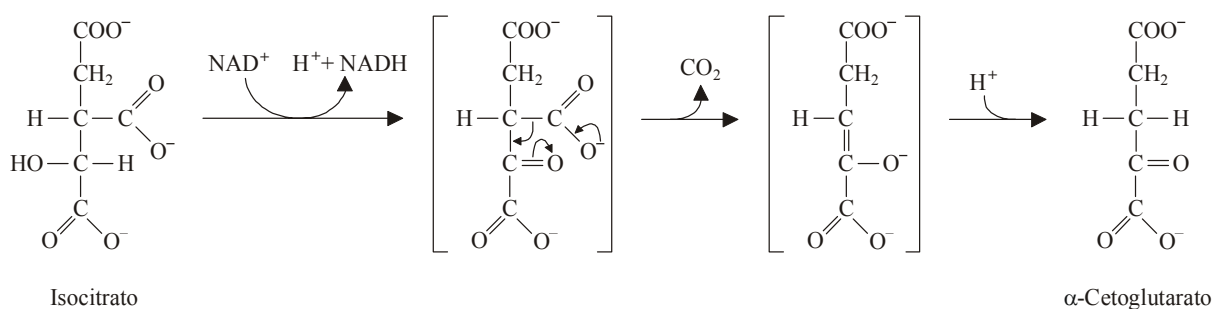
Além da condensação com o acetil–CoA para formar citrato, o oxaloacetato pode ser transformado em piruvato, glicose (gliconeogênese) e aspartato.

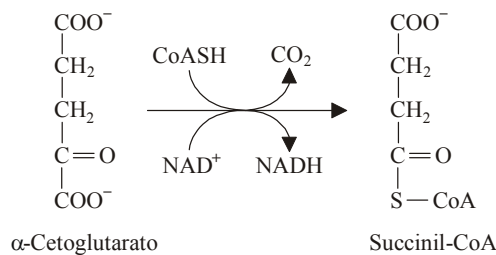
2. Isomerização do citrato em isocitrato via *cis*–aconitato. A *aconitase* catalisa a isomerização reversível do citrato e do isocitrato, por meio do intermediário *cis*–aconitato. A mistura em equilíbrio contém 90% de citrato, 4% de *cis*–aconitato e 6% de isocitrato. No meio celular, a reação é deslocada para a direita, porque o isocitrato é rapidamente removido na etapa seguinte do ciclo. A aconitase contém um centro ferro–enxôfre que atua tanto na ligação do substrato como na catálise da reação.

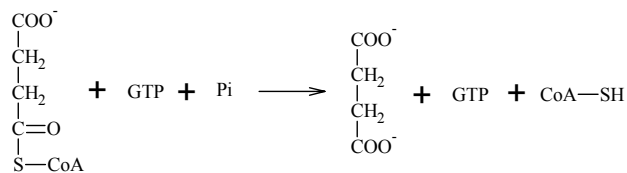
H_2O H_2O

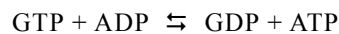
Citrato Aconitase Isocitrato

3. Descarboxilação oxidativa do isocitrato para formar α-cetoglutarato, o primeiro NADH e CO_2. Na etapa seguinte, o isocitrato é oxidado a α–cetoglutarato pela enzima alostérica *isocitrato–desidrogenase–NAD^+–dependente*. Junto à oxidação ocorre a perda simultânea de CO_2 (remoção do grupo β-carboxílico). A enzima necessita Mg^{2+} ou Mn^{2+} e é ativada pelo ADP e inibida pelo ATP e NADH.

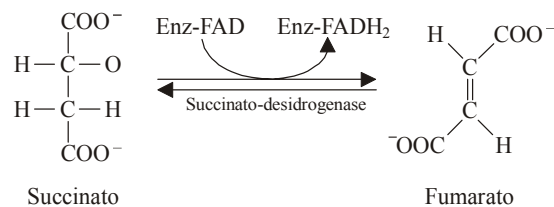
NAD^+ H^++ NADH CO_2 H^+

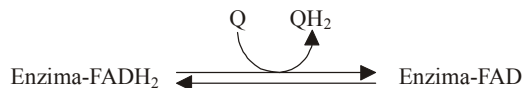
Isocitrato α-Cetoglutarato

4. Oxidação e descarboxilação do α–cetoglutarato para formar succinil–CoA, o segundo NADH e CO_2. A conversão do α–cetoglutarato em um composto de "alta energia", a succinil–CoA, é catalisada pelo complexo enzimático *α–cetoglutarato–desidrogenase*. A reação é semelhante à reação do complexo da piruvato-desidrogenase utilizada na transformação do piruvato em acetil–CoA. Participam da reação a *tiamina pirofosfato, lipoato, coenzima A, FAD* e *NAD^+*. O complexo multienzimático consiste da *α–cetoglutarato–desidrogenase, diidrolipoil–transuccinilase* e *diidrolipoil–desidrogenase* como três unidades catalíticas. A reação produz a segunda molécula de CO_2 e o segundo NADH do ciclo. O complexo é inibido pelo ATP, GTP, NADH, succinil–CoA e Ca^{2+}.

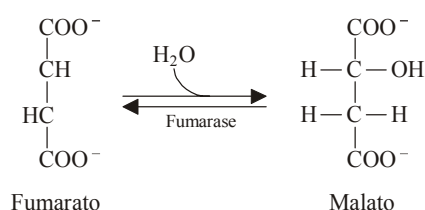
$$\alpha\text{-Cetoglutarato} \; (^{-}OOC{-}CH_2{-}CH_2{-}C(=O){-}COO^{-}) + CoASH + NAD^{+} \longrightarrow \text{Succinil-CoA} \; (^{-}OOC{-}CH_2{-}CH_2{-}C(=O){-}S{-}CoA) + CO_2 + NADH$$

5. Clivagem da succinil–CoA com formação de GTP. A *succinil–CoA–sintetase* (succinato–tiocinase) hidrolisa a ligação tioéster de "alta energia" da succinil–CoA ($\Delta G°'$ = –32,6 kJ·mol^{-1})para formar succinato. A energia liberada é conservada como *trifosfato de guanosina* (GTP) produzida a partir de GDP + P_i ($\Delta G°'$ = –30,5 kJ·mol^{-1}), em uma fosforilação ao nível do substrato. O teor energético do GTP é equivalente ao do ATP.

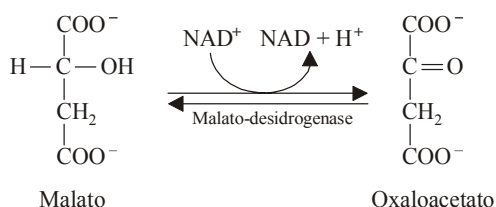
$$^{-}OOC{-}CH_2{-}CH_2{-}C(=O){-}S{-}CoA + GTP + Pi \longrightarrow {}^{-}OOC{-}CH_2{-}CH_2{-}COO^{-} + GTP + CoA{-}SH$$

Em presença da *nucleosídio–difosfato–cinase* e Mg^{2+}*,* o GTP é convertido reversivelmente em ATP:

$$GTP + ADP \leftrightarrows GDP + ATP$$

6. Oxidação do succinato para formar fumarato e $FADH_2$. O succinato é oxidado a fumarato pela *succinato–desidrogenase*. Essa enzima necessita de flavina adenina dinucleotídio (FAD) ligada covalentemente. Nas células dos mamíferos, a enzima está firmemente ligada à membrana mitocondrial interna sendo um componente da succinato–ubiquinona, um complexo multiprotéico que participa da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons. A succinato–desidrogenase é fortemente inibida competitivamente pelo malonato e ativada pelo ATP, fósforo inorgânico e succinato.

$$\text{Succinato} \; (^{-}OOC{-}CH(H){-}CH(H){-}COO^{-}) + \text{Enz-FAD} \xrightleftharpoons{\text{Succinato-desidrogenase}} \text{Fumarato} \; (H(^{-}OOC)C{=}C(H)COO^{-}) + \text{Enz-FADH}_2$$

Os co-fatores participam da transferência de elétrons do succinato para a ubiquinona.

$$\text{Enzima-FADH}_2 \overset{Q \quad QH_2}{\rightleftharpoons} \text{Enzima-FAD}$$

7. Hidratação da liga dupla do fumarato para formar malato e o terceiro NADH. O fumarato é hidratado a L–malato pela enzima *fumarase*. A enzima é estereoespecífica e catalisa a hidratação da dupla ligação *trans* do fumarato.

$$\underset{\text{Fumarato}}{\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ CH \\ | \\ HC \\ | \\ COO^- \end{array}} \underset{\text{Fumarase}}{\overset{H_2O}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{Malato}}{\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-H \\ | \\ COO^- \end{array}}$$

8. Oxidação do malato a oxaloacetato. A reação final do ciclo é catalisada pela *malato-desidrogenase* com a formação de oxaloacetato e NADH. A posição de equilíbrio dessa reação está deslocada quase totalmente para a síntese do L–malato ($\Delta G°' = +29,7\ kJ \cdot mol^{-1}$). Entretanto, a rápida remoção do oxaloacetato pela citrato sintase para a formação de citrato, possibilita a oxidação do malato.

$$\underset{\text{Malato}}{\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COO^- \end{array}} \underset{\text{Malato-desidrogenase}}{\overset{NAD^+ \quad NAD + H^+}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{Oxaloacetato}}{\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ C=O \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COO^- \end{array}}$$

Além da condensação com a acetil–CoA para formar citrato, o oxaloacetado pode ser transformado em piruvato, glicose (neoglicogênese) e aspartato (*ver* Metabolismo dos aminoácidos).

A. Energia no ciclo do ácido cítrico

O ciclo do ácido cítrico é a via oxidativa terminal para a maioria dos combustíveis metabólicos (piruvato, aminoácidos e ácidos graxos). Os dois carbonos do grupo acetila que participam do ciclo são oxidados completamente a CO_2 e H_2O. A energia liberada por essas oxidações é conservada na forma de três NADH, um $FADH_2$ e uma molécula de GTP (ou ATP). Para cada NADH que transfere seus elétrons para a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons (*ver* Capítulo 8: Fosforilação oxidativa), aproximadamente 2,5 ATP são produzidos a partir de ADP + P_i. Para cada $FADH_2$, cerca de 1,5 ATP são produzidos. Assim, a completa oxidação do grupo acetila da acetil–CoA no ciclo do ácido cítrico produz 10 ATP.

B. Regulação do ciclo do ácido cítrico

O ciclo do ácido cítrico possui vários níveis de controle para que as necessidades energéticas e biossintéticas das células sejam constantemente atingidas. A disponibilidade de substratos (acetil-CoA, NAD^+, FAD e ADP), a demanda por precursores biossintéticos provenientes do ciclo do ácido cítrico e a necessidade de ATP determinam a velocidade de operação do ciclo.

O suprimento de grupos acetil derivados do piruvato (carboidratos) ou de ácidos graxos (lipídios) é fundamental na para a velocidade do ciclo. A velocidade é influenciada por controles exercidos sobre o complexo da piruvato−desidrogenase (inibido por acetil−CoA, ATP e NADH e ativado por CoA, ADP e NAD^+) e pela regulação dos processos de transporte e β−oxidação dos ácidos graxos.

Relação [NADH]/[NAD^+]. Elevadas concentrações de NADH inibem alostericamente as três enzimas controladoras do ciclo: a citrato−sintase, a isocitrato−desidrogenase e a α−cetoglutarato−desidrogenase. A isocitrato−desidrogenase pode também ser inibida pelo ATP.

Os intermediários do ciclo podem afetar a atividade de algumas enzimas. A succinil−CoA inibe o complexo α−cetoglutarato−desidrogenase e a citrato−sintase. O oxaloacetato inibe a succinato−desidrogenase. Teores de Ca^{2+} intramitocondrial também são importantes na regulação do ciclo do ácido cítrico. A piruvato−desidrogenase é ativada pelo cálcio através da ação do cátion sobre a fosfatase regulatória. A isocitrato−desidrogenase e a α−cetoglutarato−desidrogenase são estimuladas mais diretamente pelos íons Ca^{2+}.

Alguns intermediários do ciclo do ácido cítrico podem influenciar o fluxo em outras vias, por exemplo, as enzimas glicolíticas fosfofrutocinase e piruvato−cinase, são inibidas pelo citrato e succinil−CoA, respectivamente.

A Figura 7.5 mostra a regulação do fluxo metabólico no ciclo do ácido cítrico.

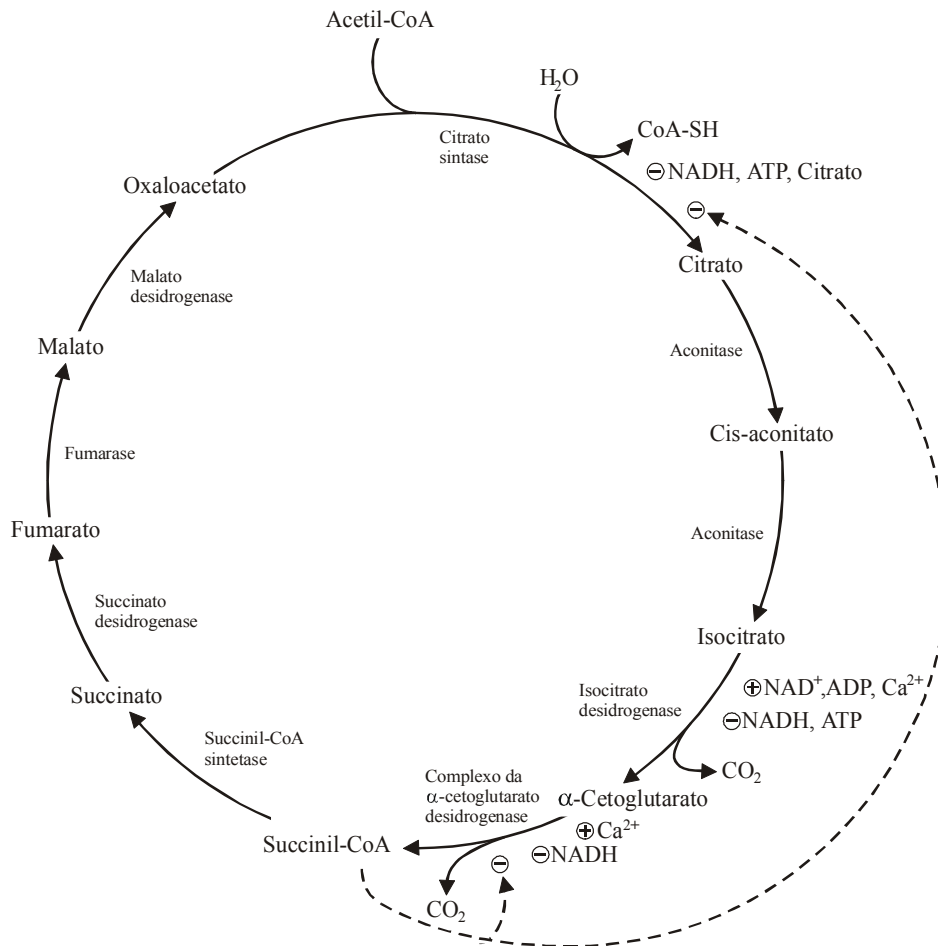



Figura 7.5
Regulação do fluxo metabólico do ciclo do ácido cítrico

7.3 Entrada e saída de intermediários do ciclo do ácido cítrico

O ciclo do ácido cítrico tem papel central no catabolismo de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, com liberação e conservação de energia. Entretanto, o ciclo também está envolvido no fornecimento de precursores para muitas vias biossintéticas. O ciclo do ácido cítrico é, portanto, *anfibólico* (anabólico e catabólico). Os intermediários do ciclo (exceto o isocitrato e o succinato) são precursores ou produtos de várias moléculas biológicas. Por exemplo, a succinil–CoA é precursora da maioria dos átomos de carbono das porfirinas. Os aminoácidos aspartato e glutamato podem ser provenientes do oxaloacetato e α–cetoglutarato, respectivamente, via reações de transaminação. A síntese de ácidos graxos e colesterol no citosol necessita de acetil–CoA gerada a partir do citrato que

atravessa a membrana mitocondrial (*ver* Capítulo 10: Metabolismo dos lipídeos).

Quadro 7.2 Ciclo do glioxilato

Nos vegetais, em certos microrganismos e em levedura é possível sintetizar carboidratos a partir de *substratos de dois carbonos* como o acetato e etanol, por meio de uma via alternativa chamada *ciclo do glioxilato*. A via emprega as enzimas do ciclo do ácido cítrico, além de duas enzimas ausentes nos tecidos animais: a *isocitrato–iase* e a *malato–sintase*. Pela ação da isocitrato–liase, o isocitrato é clivado em succinato e glioxilato. O glioxilato condensa com uma segunda molécula de acetil-CoA sob a ação da malato-sintase (em reação análoga àquela catalisada pela citrato-sintase no ciclo do ácido cítrico) para formar malato.

O malato passa para o citosol, onde é oxidado a oxaloacetato, que pode ser transformado em glicose pelas reações da gliconeogênese ou se condensar com outra molécula de acetil–CoA e iniciar outra volta do ciclo.

Nas plantas, o ciclo do glioxalato está localizado em organelas chamadas *glioxissomos*.

Os animais vertebrados não apresentam o ciclo do glioxilato e não podem sintetizar glicose a partir de acetil–CoA. Nas sementes em germinação, as enzimas do ciclo do glioxilato degradam os ácidos graxos que são convertidos em glicose, precursor da celulose.

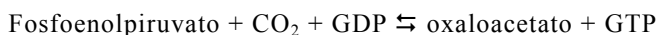
Os intermediários do ciclo do ácido cítrico desviados para a biossíntese de novos compostos devem ser repostos por reações que permitam restabelecer seus níveis apropriados. Além disso, as flutuações nas condições celulares podem necessitar de aumento na atividade do ciclo, o que requer a suplementação de intermediários. O processo de reposição de intermediários do ciclo é chamado *anaplerose* (do grego, preencher completamente). A produção de oxaloacetato permite a entrada do grupo acetila no ciclo do ácido cítrico (oxaloacetato + acetil–CoA → citrato) e é a mais importante reação anaplerótica.

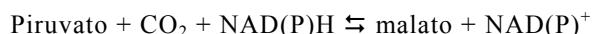
Em deficiências de qualquer dos intermediários do ciclo, o oxaloacetato é formado pela carboxilação reversível do piruvato por CO_2, em reação catalisada pela *piruvato–carboxilase* que contém *biotina* como coenzima. O excesso de acetil-CoA ativa alostericamente a enzima.

$$\text{Piruvato} + CO_2 + ATP + H_2O \leftrightarrows \text{oxaloacetato} + ADP + P_i$$

As reações do ciclo convertem o oxaloacetato nos intermediários deficientes para que se restabeleça sua concentração apropriada.

A síntese do oxaloacetato ocorre também a partir do fosfoenolpiruvato e é catalisada pela *fosfoenolpiruvato–carboxicinase* presente tanto no citosol como na matriz mitocondrial. A enzima é ativada pelo intermediário glicolítico frutose–1,6–bifosfato, cuja concentração aumenta quando o ciclo do ácido cítrico atua lentamente.

$$\text{Fosfoenolpiruvato} + CO_2 + GDP \leftrightarrows \text{oxaloacetato} + GTP$$

Pela ação conjunta das duas enzimas malato–desidrogenase (“enzima málica”), o malato (e o oxaloacetato) pode ser produzido a partir do piruvato:

$$\text{Piruvato} + CO_2 + NAD(P)H \leftrightarrows \text{malato} + NAD(P)^+$$

Outras reações que abastecem o ciclo do ácido cítrico incluem a succinil-CoA, um produto do catabolismo de ácidos graxos de cadeia ímpar, e os α–cetoácidos a partir do α–cetoglutarato e oxaloacetato

provenientes dos aminoácidos glutamato e aspartato, respectivamente, via reações de transaminação.

Por reversão de reações anapleróticas, os intermediários do ciclo do ácido cítrico servem como precursores de glicose. Essa função é demonstrada em certas espécies de microrganismos e plantas que utilizam o *ciclo do glioxilato* na síntese de carboidratos a partir da acetil–CoA.

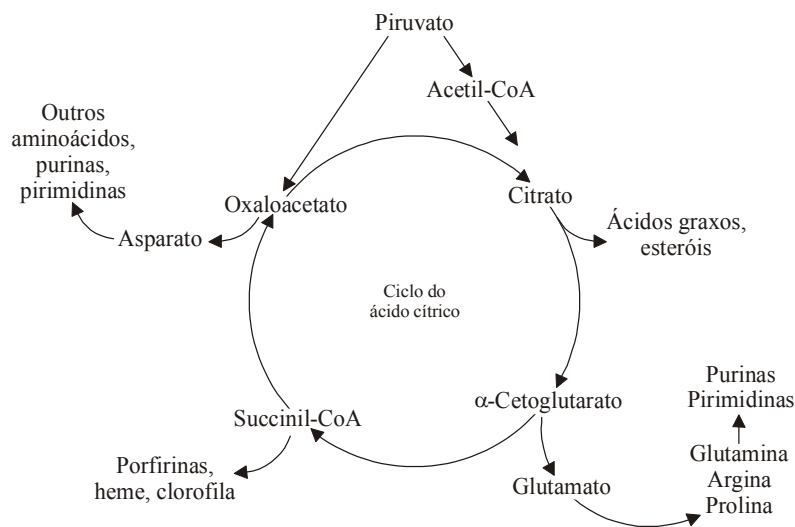



Figura 7.6
Papel biossintético do ciclo do ácido cítrico. Os intermediários do ciclo do ácido cítrico são precursores biossintéticos de vários compostos.

Resumo

1. Os organismos aeróbicos empregam o oxigênio para gerar energia a partir de combustíveis metabólicos por vias bioquímicas: ciclo do ácido cítrico, cadeia mitocondrial transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa.

2. O ciclo do ácido cítrico é uma série de oito reações sucessivas que oxidam completamente substratos orgânicos, como carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos para formar CO_2, H_2O e coenzimas reduzidas NADH e $FADH_2$. O piruvato, o produto da via glicolítica, é convertido a acetil−CoA, o substrato para o ciclo do ácido cítrico.

3. Os grupos acetila entram no ciclo do ácido cítrico como acetil–CoA produzidos a partir do piruvato por meio do complexo multienzimático da piruvato−desidrogenase que contêm três enzimas e cinco coenzimas.

4. Além do papel gerador de energia, o ciclo do ácido cítrico também exerce importantes papéis, biossíntese de glicose (gliconeogênese), de aminoácidos, de bases nucleotídicas e de grupos heme.

5. O ciclo do glioxilato, encontrado em alguns vegetais e em alguns fungos, é uma versão modificada do ácido cítrico no qual as moléculas de dois carbonos, como o acetato, são convertidos em precursores da glicose.

Referências

BLACKSTOCK, J. C, **Biochemistry.** Oxford: Butterworth, 1998. p. 47-75.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica.** 3 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2000. p. 492-519.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger:** Princípios de bioquímica. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 441-64.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório:** princípios e interpretações. 4 ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. p. 75-103.

VALTER T. MOTTA

BIOQUÍMICA BÁSICA

Fosforilação Oxidativa

8

Fosforilação Oxidativa

Objetivos

1. Ordenar os componentes da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, de acordo com seus potenciais redox.
2. Calcular a energia livre padrão da oxidação de um composto, dado o potencial redox padrão.
3. Comparar a energia livre padrão de oxidação de um mol de $FADH_2$ e de 1 mol de NADH na cadeia respiratória, até a formação de H_2O.
4. Explicar como a energia da oxidação de substâncias pode ser utilizada para a síntese de ATP.
5. Explicar a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa através da hipótese quimiosmótica.
6. Comparar os efeitos de um inibidor da oxidação, de um inibidor da fosforilação e de um desacoplador, sobre o consumo de oxigênio e sobre a produção de ATP.
7. Explicar os mecanismos do estresse oxidativo

A degradação de moléculas nutrientes gera um número reduzido de moléculas de ATP diretamente pela fosforilação ao nível do substrato. No entanto, as etapas oxidativas da glicólise, ciclo ácido cítrico, β-oxidação dos ácidos graxos e da degradação de alguns aminoácidos produzem ATP indiretamente. Isso ocorre pela reoxidação das coenzimas NADH e $FADH_2$ formadas pela oxidação de macromoléculas e que transferem seus elétrons para o O_2 por meio da *cadeia mitocondrial transportadora de elétrons*. A cadeia é formada por complexos protéicos (centros redox) localizados na membrana mitocondrial interna e ligados firmemente a grupos prostéticos capazes de aceitar e doar elétrons (reações de oxidação-redução). Grande parte da energia liberada no sistema bombeia prótons para fora da matriz mitocondrial, gerando um gradiente eletroquímico de H^+. O retorno dos prótons para a matriz mitocondrial libera energia livre que é canalizada para a síntese de ATP a partir de ADP e P_i, por meio da *fosforilação oxidativa*. Essa é a maior fonte de ATP nas células eucarióticas. Existe um estreito acoplamento entre a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons e a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. O ATP é um transdutor energético universal dos sistemas vivos que é utilizado na condução da maioria das reações dependentes de energia.

As necessidades energéticas diárias de um homem de 70 kg em ocupação sedentária é, aproximadamente, 10.000 kJ. A energia livre padrão de hidrólise do ATP é −30,5 $kJ \cdot mol^{-1}$. Esse indivíduo deve, portanto, hidrolizar o equivalente a 328 moléculas ou 165 kg de ATP por dia, no entanto, o corpo contém somente cerca de 50 g de ATP. O cálculo sugere que cada molécula de ATP é sintetizada e desfosforilada mais de 3.000 vezes a cada 24 horas para suprir de energia as atividades do organismo. O atendimento da maior parte dessas necessidades tem lugar na membrana mitocondrial interna e é realizada por dois sistemas acoplados: a *cadeia mitocondrial transportadora de elétrons* e a *fosforilação oxidativa*.

8.1 Estrutura mitocondrial

Os processos de liberação e conservação da maior parte de energia livre nas células aeróbicas são realizados nas mitocôndrias. O número de mitocôndrias em diferentes tecidos reflete a função fisiológica do mesmo e determina a capacidade de realizar funções metabólicas aeróbicas. O eritrócito, por exemplo, não possui mitocôndrias e, portanto, não apresenta a capacidade de liberar energia usando o oxigênio como aceptor terminal de elétrons. Por outro lado, a célula cardíaca apresenta metade de seu volume citosólico composto de mitocôndrias e é altamente dependente dos processos aeróbicos.

A mitocôndria é formada por duas membranas com diferentes propriedades e funções biológicas. A membrana externa lisa é composta de lipídeos (fosfolipídeos e colesterol) e proteínas, com poucas funções enzimáticas e de transporte. Contêm unidades da proteína *porina,* que formam canais transmembrana onde ocorre a livre difusão de vários íons e de moléculas pequenas.

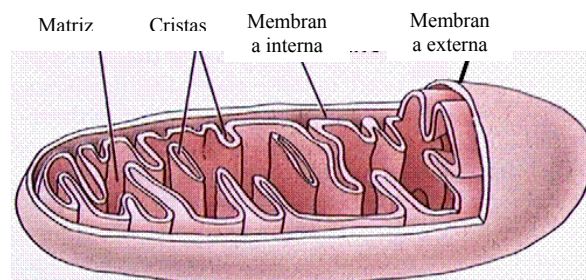



Figura 8.1
Mitocôndria. (a) *Acima:* diagrama de um corte de uma mitocôndria. (b) *Abaixo:* microfotografia eletrônica

A membrana mitocondrial interna é composta de 75% de proteínas e contêm as enzimas envolvidas no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa. Contêm também, enzimas e sistemas de transporte que controlam a transferência de metabólitos entre o citosol e a matriz mitocondrial. Ao contrário da membrana externa, a interna é virtualmente impermeável para a maioria das moléculas polares pequenas e íons. A impermeabilidade da membrana mitocondrial interna promove a compartimentalização das funções metabólicas entre o citosol e a mitocôndria. Os compostos se movem através da membrana mitocôndrial mediados por proteínas específicas denominadas *carreadores* ou *translocases.* A membrana mitocondrial interna apresenta pregas voltadas para o interior (circunvoluções), chamadas *cristas* que aumentam a superfície da membrana e cujo número reflete a atividade respiratória da célula.

O espaço entre a membrana externa e a membrana interna é conhecido como *espaço intermembranas* e é equivalente ao citosol quanto as suas concentrações em metabólitos e íons. A região delimitada pela membrana interna é denominada *matriz mitocondrial.*

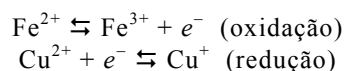
Os principais características bioquímicas das mitocondriais são:

- *Membrana externa.* Livremente permeável a moléculas pequenas e íons.
- Membrana interna. Impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons, incluindo o H^+, Na^+, K^+, ATP, ADP, Ca^{2+}, P, o piruvato, etc. A membrana contêm: cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, ADP-ATP−translocases, ATP−sintase (F_oF_1) e outros transportadores de membrana.
- *Matriz mitocondrial.* Contêm: complexo da piruvato-desidrogenase, enzimas do ciclo do ácido cítrico, enzimas da β−oxidação dos ácidos graxos, enzimas da oxidação dos aminoácidos, várias outras enzimas, ribossomos, DNA, ATP, ADP, P_i, Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^+ e outros substratos solúveis.

8.2 Reações de oxidação-redução

As reações de oxidação-redução (reações redox) envolvem a transferência de elétrons que passam de um *doador de elétrons* (redutor) para um *aceptor de elétrons* (oxidante). Portanto, a

oxidação é a perda de elétrons, enquanto, a redução é o ganho de elétrons. Nenhuma substância pode doar elétrons sem que outra os receba. Assim, uma reação de oxidação-redução total é composta de *duas meias–reações* acopladas (uma reação de oxidação e uma reação de redução) e constituem um *par redox*:

$$Fe^{2+} \leftrightarrows Fe^{3+} + e^- \text{ (oxidação)}$$
$$Cu^{2+} + e^- \leftrightarrows Cu^+ \text{ (redução)}$$

Em algumas reações de oxidação-redução são transferidos tanto elétrons como prótons (átomos de hidrogênio):

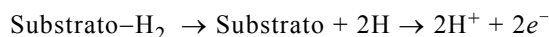
$$\text{Substrato–}H_2 \rightarrow \text{Substrato} + 2H \rightarrow 2H^+ + 2e^-$$

A tendência com a qual um doador de elétrons (redutor) perde seus elétrons para um aceptor eletrônico (oxidante) é expressa quantitativamente pelo potencial de redução do sistema. O *potencial–padrão de redução* ($E°'$) é definido como a *força eletromotiva* (fem), em volts (V), gerado por uma meia-célula onde os dois membros do par redox conjugado são comparados a uma meia-célula referência padrão de hidrogênio ($2H^+ + 2e^- \leftrightarrows H_2$) a 25°C e 1 atm sob condições padrão. O potencial–padrão da meia reação do hidrogênio em pH 7,0 é $E°' = -0{,}42$ V (volts). A Tabela 8.1 apresenta os valores de potenciais-padrão de redução de alguns pares redox.

Tabela 8.1 – Potenciais–padrão de redução (E°′) de algumas reações parciais bioquímicas.

Par redox	E°′ (V)
Succinato + CO_2 + $2e^-$ ⇆ *α*-cetoglutarato	−0,67
$2H^+ + 2e^- \leftrightarrows H_2$	−0,42
α-Cetoglutarato + CO_2 + H^+ + $2e^-$ ⇆ isocitrato	−0,38
Acetoacetato + $2H^+$ $2e^-$ ⇆ *β*-hidroxibutirato	−0,35
$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrows NADH + H^+$	−0,32
Lipoato + $2H^+$ + $2e^-$ ⇆ diidrolipoato	−0,29
Acetaldeído + $2H^+$ + $2e^-$ ⇆ etanol	−0,20
Piruvato + $2H^+$ + $2e^-$ ⇆ lactato	−0,19
Oxaloacetato + $2H^+$ + $2e^-$ ⇆ malato	−0,17
Coenzima Q (oxid) + $2H^+$ + $2e^-$ ⇆ coenzima Q (red)	0,10
Citocromo *b* (Fe^{3+}) + e^- ⇆ citocromo *b* (Fe^{2+})	0,12
Citocromo *c* (Fe^{3+}) + e^- ⇆ citocromo *c* (Fe^{2+})	0,22
Citocromo *a* (Fe^{3+}) + e^- ⇆ citocromo *a* (Fe^{2+})	0,29
Citocromo a_3 (Fe^{3+}) + e^- ⇆ citocromo a_3 (Fe^{2+})	0,39
$\frac{1}{2} O_2 + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrows H_2O$	0,82

Quanto maior o potencial–padrão de redução, maior a afinidade da forma oxidada do par redox em aceitar elétrons e, assim, tornar-se reduzida.

O potencial de redução depende das concentrações das espécies oxidadas e reduzidas. O potencial de redução (E) está relacionado com o potencial–padrão de redução ($E°'$) pela equação de Nernst (proposta em 1881):

$$E' = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[receptor\ de\ elétrons]}{[doador\ de\ elétrons]}$$

onde *E´*= potencial de redução para as concentrações encontradas na célula em pH 7,0, *E*°′ = potencial–padrão de redução, *R* = constante dos gases (8,31 J K^{-1} mol^{-1}, *T* = temperatura absoluta em graus K (Kelvin)(298K a 25°C), *n* = número de elétrons transferidos, *F* = constante de Faraday (96.485 J V^{-1} mol^{-1}, é a carga elétrica de 1 mol de eletrons) e ln = logaritmo natural. A 25°C, esta equação se reduz a:

$$E' = E^{o'} + \frac{59}{n} \log \frac{[receptor\ de\ elétrons]}{[doador\ de\ elétrons]}$$

Onde *E*′ e *E*°′ são expressos em V (volts).

A energia disponível para a realização de trabalho é proporcional a Δ*E* (diferença nos potenciais de redução). Quando o valor de Δ*E* for positivo, Δ*G* será negativa e indica um processo espontâneo e pode produzir trabalho.

8.3 Cadeia mitocondrial transportadora de elétrons

Nas células eucarióticas o estágio final da oxidação de nutrientes ocorre na mitocôndria. A organela promove a rápida oxidação do NADH e $FADH_2$ produzidos nas reações de glicólise, ciclo do ácido cítrico, β−oxidação dos ácidos graxos e oxidação de alguns aminoácidos. A transferência de elétrons do NADH e $FADH_2$ para O_2 se realiza em uma sequência de reações de oxidorredução em processo denominado *cadeia mitocondrial transportadora de elétrons* (CMTE) também conhecido como cadeia respiratória. A cadeia consiste de uma série de transportadores de elétrons que operam seqüencialmente, formados por proteínas integrais de membranas associadas a grupos prostéticos capazes de aceitar ou doar elétrons. Os elétrons passam através dessa cadeia do menor para o maior potencial-padrão de redução. Na medida que os elétrons são transferidos ao longo da cadeia, ocorre a liberação de energia livre suficiente para sintetizar ATP a partir do ADP e P_i por meio da *fosforilação oxidativa.*

Os componentes da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons estão localizados na *superfície interna da membrana mitocondrial interna* por onde os elétrons provenientes do NADH e $FADH_2$ fluem para o oxigênio molecular. Os transportadores de elétrons funcionam em complexos multienzimáticos conhecidos como *NADH−coenzima Q oxidorredutase* (complexo I), *succinato−coenzima Q oxidorredutase* (complexo II), *coenzima Q-citocromo c oxidorredutase* (complexo III) e *citocromo c oxidase* (complexo IV). Os grupos prostéticos transportadores de elétrons associados aos complexos protéicos são: *nucleotídeos da nicotinamida* (NAD^+ ou $NADP^+$), *nucleotídeos da flavina* (FMN ou FAD), *ubiquinona* (coenzima Q), *citocromos* e *proteínas ferro−enxôfre*.

NAD^+, $NADP^+$ e FAD

Apesar das estruturas do NADH e NADPH serem semelhantes, suas funções diferem consideravelmente. O NADH é reconvertido a NAD^+ na cadeia respiratória mitocondrial transportadora de elétrons, fundamentalmente para a geração de ATP. O NADPH fornece íons hidretos para a maioria dos processos sintéticos. Neste contexto é examinado somente a reoxidação do NADH na cadeia respiratória mitocondrial.

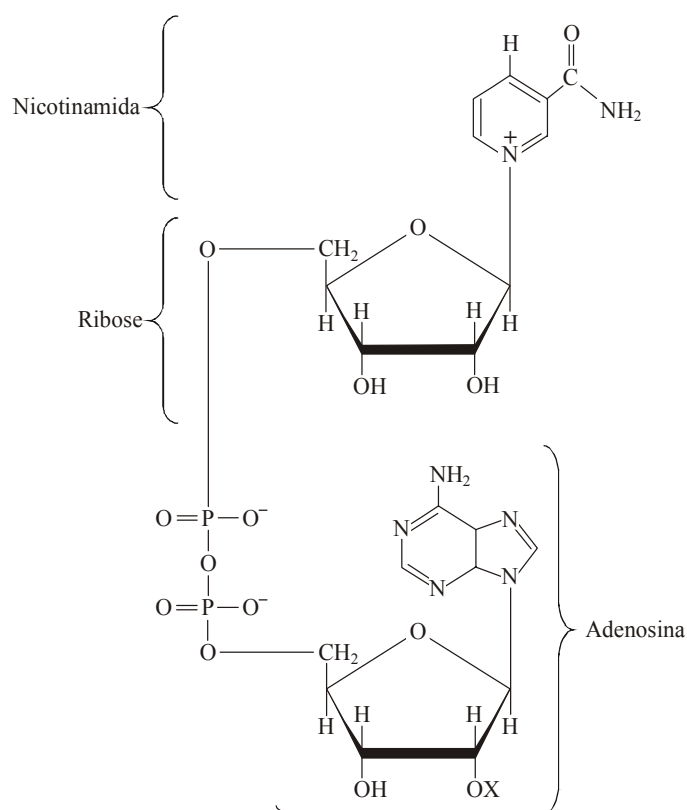
Tabela 8.2 – Características dos componentes protéicos da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons

Complexo enzimático	Grupo prostético
I (NADH–coenzima Q oxidorredutase)	FMN, FeS*
II (Succinato–coenzima Q oxidorredutase)	FAD, FeS
III (Coenzima Q–citocromo *c* oxidorredutase)	Citocromo *b* Citocromo c_1 1 FeS_R**
IV (Citocromo *c* oxidase)	Citocromo *a* Citocromo a_3 Cu_A, Cu_B

*FeS = grupo ferro–enxofre.

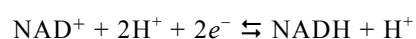
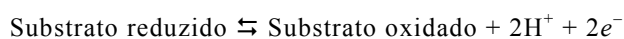
**FeS_R = centro de Rieske

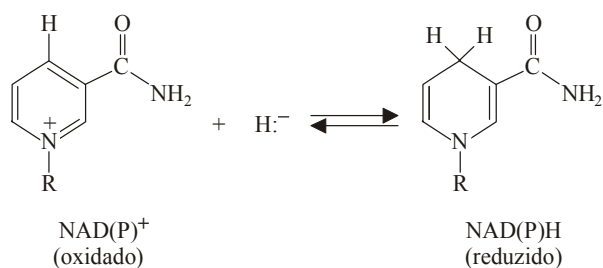
A. Complexo I transfere elétrons do NADH para a ubiquinona

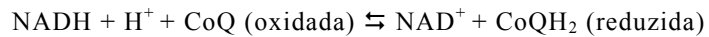
A transferência de elétrons através da cadeia respiratória inicia com o complexo I (também chamado NADH–coenzima Q oxidorredutase ou NADH desidrogenase) catalisa a transferência de dois elétrons do NADH (nicotinamida adenina dinucleotídio) para a coenzima Q (ubiquinona). As principais fontes de NADH incluem reações do ciclo do ácido cítrico e da oxidação dos ácidos graxos. Composto por 43 cadeias polipeptídicas diferentes, o complexo I é a maior proteína transportadora de elétrons. Além de uma molécula de FMN (flavina mononucleotídeo), o complexo contêm sete centros ferro–enxôfre (FeS). Os centros ferro–enxôfre podem consistir de dois ou quatro átomos de ferro complexado com igual número de íons sulfeto, mediam a transferência de um elétron. As proteínas que contêm centros ferro–enxofre são também conhecidas como *ferro–proteínas sem heme.*

$X = H$ Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD^+)
$X = PO_3^{2-}$ Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato ($NADP^+$)

As reações catalisadas pelas desidrogenases são exemplificadas esquematicamente pelas equações:

$$\text{Substrato reduzido} \leftrightarrows \text{Substrato oxidado} + 2H^+ + 2e^-$$

$$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrows NADH + H^+$$

Esta reação envolve a transferência reversível de dois prótons + dois elétrons do substrato para o NAD^+. Um próton (H^+) é liberado para o meio e o *íon hidreto,* $:H^-$ (um próton + dois elétrons), é incorporado na posição 4 do anel de nicotimanida do NAD^+:

$NAD(P)^+$ (oxidado) + $H:^-$ ⇄ NAD(P)H (reduzido)

O NADH é oxidado a NAD^+ pela ação do *Complexo I* com a transferência de + $2H^+$ + $2e^-$ para a *coenzima Q* (*CoQ* ou *ubiquinona*) na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons:

$$NADH + H^+ + CoQ\ (oxidada) \leftrightarrows NAD^+ + CoQH_2\ (reduzida)$$

A transferência envolve várias etapas intermediárias que ainda não foram completamente esclarecidas. Os elétrons são transferidos inicialmente do NADH para a FMN, um dos grupos prostéticos da enzima, para produzir a forma reduzida $FMNH_2$.

$$NADH + H^+ + FMN \leftrightarrows FMNH_2 + NAD^+$$

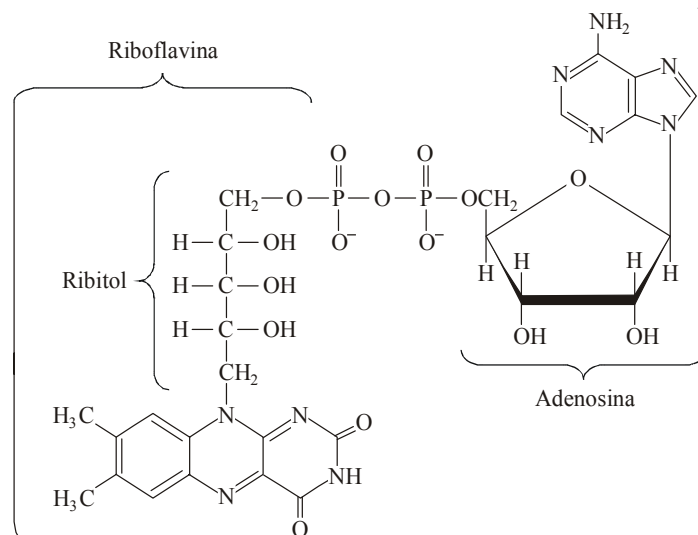
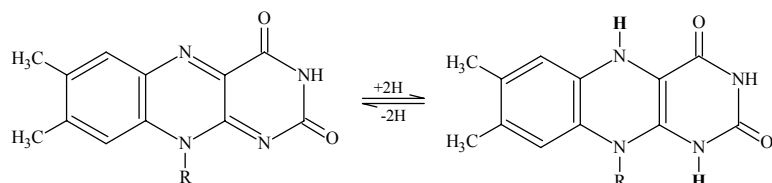
Riboflavina

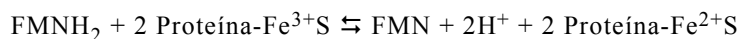
Ribitol

Adenosina

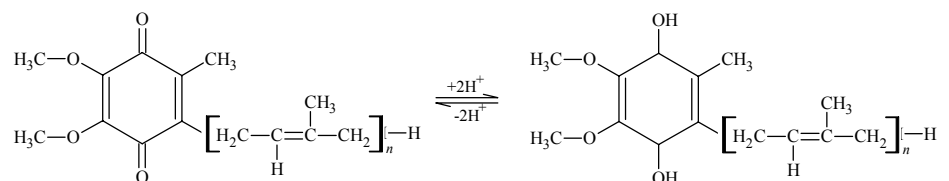
Flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD)

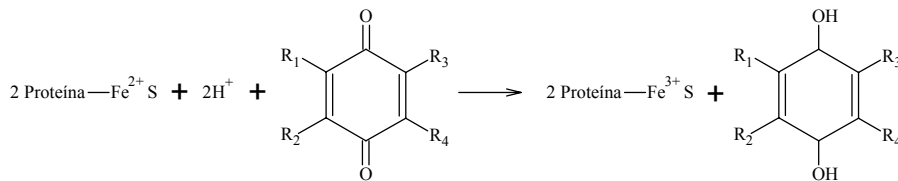
+2H

-2H

A seguir os elétrons são transferidos da $FMNH_2$ para uma série de *proteínas ferro–enxôfre* (FeS) cujos grupos mais comuns são 2Fe–2S e 4Fe–4S. O estado oxidado férrico (Fe^{3+}) dos grupos capta os elétrons da $FMNH_2$ com a liberação de prótons conforme a equação:

$$FMNH_2 + 2\ Proteína\text{-}Fe^{3+}S \leftrightarrows FMN + 2H^+ + 2\ Proteína\text{-}Fe^{2+}S$$

As proteínas ferro-enxôfre reduzidas são reoxidadas pela *coenzima Q* (CoQ), um pequeno composto lipossolúvel presente em virtualmente todos os sistemas vivos. A CoQ aceita elétrons das flavoproteínas e é reduzida a $CoQH_2$ em reação reversível de transferência de elétrons:

$+2H^+$

$-2H^+$

A reação seguinte mostra a reoxidação das proteínas ferro–enxôfre na cadeia respiratória mitocondrial pela coenzima Q:

$$2\ \text{Proteína—Fe}^{2+}\text{S} + 2H^{+} + \text{(quinona: O, } R_1, R_2, R_3, R_4\text{, O)} \longrightarrow 2\ \text{Proteína—Fe}^{3+}\text{S} + \text{(OH, } R_1, R_2, R_3, R_4\text{, OH)}$$

Durante a transferência de dois elétrons através dos centros redox do Complexo I, quatro prótons são translocados da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana.

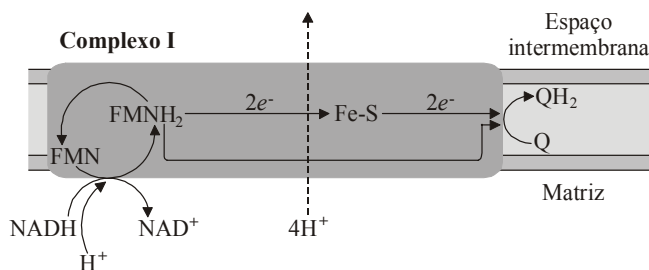



Figura 8.2
Fluxo de elétrons e prótons por meio do Complexo I. Os elétrons passam do NADH para a coenzima Q por vários centros ferro-enxôfre. A redução do Q a QH_2 também necessita de dois prótons. Quatro prótons são transferidos da matriz para o espaço intermembrana. O fluxo de prótons gera um potencial eletroquímico através da membrana mitocondrial interna que conserva parte da energia liberada pelas reações de transferência de prótons para a síntese de ATP.

B. Succinato-coenzima Q oxidorredutase (Complexo II)

Uma via independente do Complexo I, permite a entrada de elétrons de potencial relativamente alto na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, utilizando o complexo *succinato–coenzima Q oxidorredutase* (*complexo II*) que também catalisa a redução da CoQ a $CoQH_2$. Os grupos redox incluem o FAD (*flavina adenina dinucleotídeo*), proteínas Fe-S e o citocromo b_{560}. O $FADH_2$ é formado no ciclo do ácido cítrico pela oxidação do succinato a fumarato em presença da enzima *succinato–desidrogenase*, pertencente ao complexo II. Desse modo, o $FADH_2$ produzido não deixa o complexo, mas seus elétrons são transferidos para as proteínas ferro-enxôfre e a seguir para a CoQ para entrar na cadeia. Do mesmo modo, o $FADH_2$ da *glicerol–fosfato–desidrogenase* e *acil–CoA–desidrogenase* transferem seus elétrons de alto potencial para a CoQ formando $CoQH_2$. *O complexo II não bombeia prótons através da membrana mitocondrial, pois a variação de energia livre é insuficiente.* Em conseqüência, forma-se menos ATP pela oxidação do $FADH_2$ que pela do NADH (*ver* adiante).

Apesar dos nomes, os complexos I e II não operam em série, mas ambos atingem o mesmo resultado.

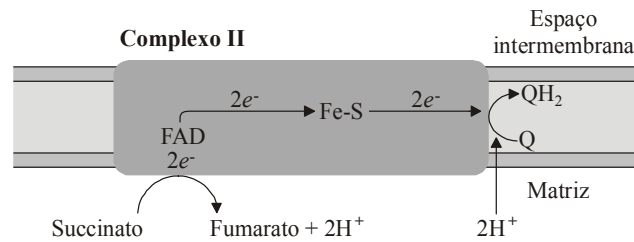
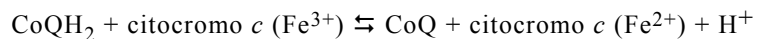



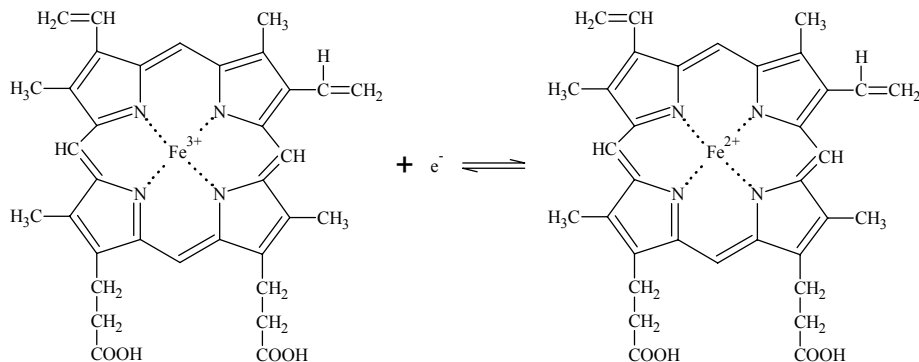
Figura 8.3
Fluxo de elétrons por meio do Complexo II. Os elétrons do succinato passam por uma flavoproteína e várias centros FeS para atingir o Q. O complexo II não contribui diretamente para gradiente de concentração mas serve para suprir de elétrons a cadeia mitocondrial de trnasporte.

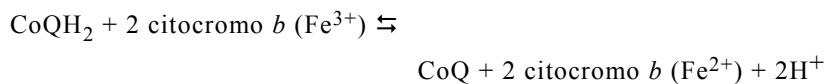
C. Complexo III transfere elétrons da $CoQH_2$ para o citocromo c

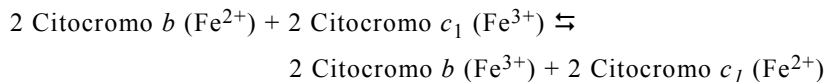
O complexo III (coenzima Q-citocromo c oxidorredutase ou citocromo bc_1) catalisa a transferência de elétrons da $CoQH_2$ para o citocromo *c* com o transporte de prótons da matriz para o espaço intermembranas.

$$CoQH_2 + \text{citocromo } c\ (Fe^{3+}) \leftrightarrows CoQ + \text{citocromo } c\ (Fe^{2+}) + H^+$$

O complexo enzimático é formado no mínimo por oito proteínas diferentes, incluindo dois *citocromos b* (tipos b_{562} e b_{566}) que apresentam potenciais de oxidorredução diferentes, um *citocromo* c_1 e uma proteína ferro-enxôfre. Devido a essa composição, o complexo III as vezes é denominado complexo citocromo bc_1.

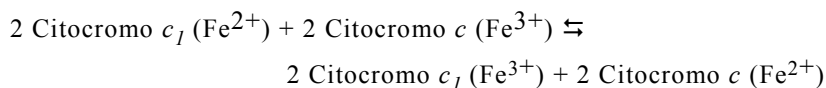
Nos organismos aeróbicos as funções geradoras de energia possuem vários citocromos, localizados na membrana mitocondrial interna. Os citocromos são proteínas transportadoras de elétrons caracterizadas pela presença de um grupo *heme* (ferro-protoporfirina) como grupo prostético. As porfirinas são compostos tetrapirrólicos que permitem numerosas variações em sua estrutura, dependendo dos substituintes no núcleo pirrólico e de suas disposições específicas. No decorrer dos ciclos catalíticos, os átomos de ferro dos citocromos oscilam entre o estado oxidado férrico (Fe^{3+}), e o estado reduzido ferroso (Fe^{2+}. Os citocromos são classificados pela natureza das cadeias laterais do grupo heme em três classes principais, denominadas *a, b* e *c*.

A CoQ reduzida é reoxidada pelo *citocromo b.* O centro reagente deste intermediário redox é o átomo de ferro do complexo porfirínico:

Quando o citocromo *b* atua como agente oxidante, o átomo de ferro é convertido de Fe^{3+} (férrico) para Fe^{2+} (ferroso). Ou seja, cada molécula de citocromo *b* aceita um elétron. Como a oxidação da $CoQH_2$ envolve a remoção de dois elétrons (e dois prótons), a completa oxidação de uma molécula deste intermediário necessita *duas* moléculas de citocromo *b*. Os prótons são liberados para o meio:

$$CoQH_2 + 2\text{ citocromo } b\ (Fe^{3+}) \leftrightarrows CoQ + 2\text{ citocromo } b\ (Fe^{2+}) + 2H^+$$

O citocromo *b* é, subsequentemente, oxidado pelo *citocromo* c_1. O carreador, como todos os citocromos, é um complexo ferro-porfirina–proteína. Os citocromos diferem entre si com respeito tanto a porção protéica como à porfirínica. Entretanto, as reações redox de todos os citocromos envolvem a oxidação e redução do ferro:

$$2\text{ Citocromo } b\ (Fe^{2+}) + 2\text{ Citocromo } c_1\ (Fe^{3+}) \leftrightarrows 2\text{ Citocromo } b\ (Fe^{3+}) + 2\text{ Citocromo } c_1\ (Fe^{2+})$$

O citocromo c_1 reduzido transfere os elétrons para o *citocromo c,* uma proteína heme (protoporfirina IX) frouxamente ligada à cisteína da proteína na superfície interna da membrana.

Quando o citocromo *c* reage com o citocromo c_1 ocorre a transferência de elétrons entre os átomos de ferro:

$$2\text{ Citocromo } c_1\ (Fe^{2+}) + 2\text{ Citocromo } c\ (Fe^{3+}) \leftrightarrows 2\text{ Citocromo } c_1\ (Fe^{3+}) + 2\text{ Citocromo } c\ (Fe^{2+})$$

A oxidação de uma molécula de QH_2 é acompanhada pela translocação de *quatro prótons* através da membrana mitocondrial interna para o espaço intermembrana (dois prótons da matriz e outros dois da QH_2).

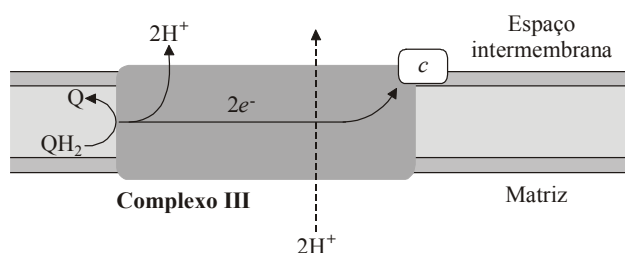
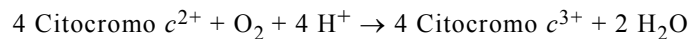



Figura 8.4
Fluxo de transporte de elétrons e prótons por meio do Complexo III. Os

elétrons passam do QH_2 para o citocromo *c*. Quatro prótons são translocados através da membrana: dois da matriz e dois do QH_2.

D. Complexo IV oxida o citocromo c e reduz o O_2

O complexo IV (citocromo *c* oxidase) é um complexo protéico que catalisa a transferência de quatro elétrons do citocromo *c* até o oxigênio molecular para formar água:

$$4 \text{ Citocromo } c^{2+} + O_2 + 4 H^+ \rightarrow 4 \text{ Citocromo } c^{3+} + 2 H_2O$$

Os centros redox do complexo IV nos mamíferos incluem grupos heme e íons cobre situados entre as 13 subunidades em cada metade do complexo dimérico.

Cada elétron é transferido do citocromo *c* para o centro redox Cu_A, que contêm dois íons cobre, e então para o grupo heme *a*. A seguir, o elétron viaja para para um centro binuclear que consiste do átomo de ferro do heme a_3 e um íon cobre (Cu_B). A redução do O_2 pelos quatro elétrons ocorre no centro binuclear FeCu. A redução do O_2 a H_2O consome quatro prótons da matriz mitocondrial.

A citocromo *c* oxidase também *transloca dois prótons* da matriz para o espaço intermembrana.

O mecanismo preciso desta fase não está totalmente esclarecido. A presença de íons de cobre é crítica para a transferência final dos elétrons para o oxigênio.

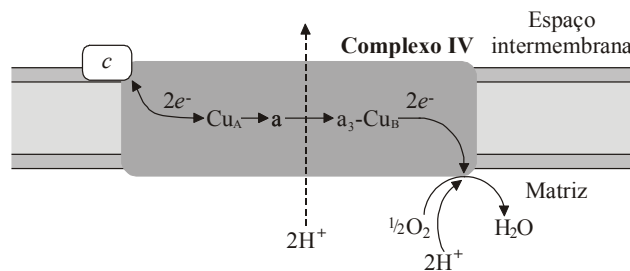



Figura 8.5
Fluxo de elétrons e prótons por meio do Complexo IV. Os átomos de ferro dos grupos heme no citocromo e os átomos de cobre são oxidados e reduzidos no fluxo de elétrons. O Complexo IV contribui para a concentração de prótons de dois modos: a translocação de prótons da matriz para o espaço intermembrana ocorre em associação com a transferência de elétrons e a formação de água remove prótons da matriz.

E. Energia livre da transferência dos elétrons do NADH para o O_2

A medida de variação de energia livre das reações de oxido-redução é dependente da diferença de voltagem entre potenciais-padrão de redução, $\Delta E°'$, do par redox:

$$\Delta E°' = E°' \text{ (aceptor de elétrons)} - E°' \text{ (doador de elétrons)}$$

A variação de energia livre padrão para a reação é dada pela equação:

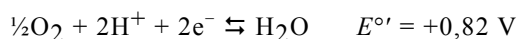
$$\Delta G°' = -nF\Delta E°'$$

onde $\Delta G°'$ é a variação de energia livre padrão, *n* é o número de elétrons transferidos por mol de reagente convertido, *F* é a constante

de proporcionalidade *faraday* (1 F = 96.485 $J{\cdot}V^{-1}\cdot mol^{-1}$), (um fator que converte volt/equivalente a joule/equivalente) e $\Delta E°'$ é a diferença entre os potenciais-padrão de redução do par redox.

Na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons dois elétrons são transferidos do NADH (doador de elétrons) através de uma série de aceptores de elétrons com potenciais de redução crescentes até o O_2 (aceptor de elétrons). As reações parciais para a oxidação do NADH pelo O_2 são expressas:

$$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrows NADH + H^+ \qquad E°' = -0{,}32\ V$$

$$½O_2 + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrows H_2O \qquad E°' = +0{,}82\ V$$

$$\Delta E°' = +0{,}820 - (-0{,}320)\ mV = +1{,}14\ mV$$

A variação de energia livre padrão é então dada por

$$\Delta G°' = -2 \times 96.485 \times 1{,}14\ V$$

$$\Delta G°' = -218\ kJ{\cdot}mol^{-1}$$

A energia livre global liberada (–218 $kJ{\cdot}mol^{-1}$) é suficiente para sintetizar ATP a partir de ADP e P_i por meio da *fosforilação oxidativa*.

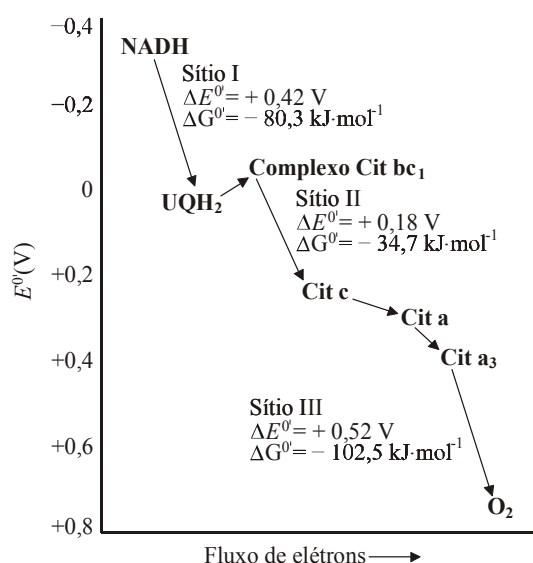
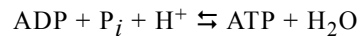



Figura 8.6
Relações energéticas na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons. A redução na energia livre ocorre em três etapas. Em cada etapa (sítios I, II e III) a energia liberada é suficiente para a síntese de ATP.

8.4 Fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa é o processo no qual a energia gerada pela cadeia mitocondrial transportadora de elétrons (CMTE) é conservada na forma de ATP. O processo é responsável pela maioria do ATP sintetizado em organismos aeróbicos. O fluxo de elétrons pela CMTE, desde o par $NADH/NAD^+$ até o par O_2/H_2O, libera energia livre que é acoplada ao transporte de prótons por meio de uma

membrana impermeável ao próton, e é conservada como um potencial eletroquímico de membrana. O fluxo transembrana de prótons fornece energia livre para a síntese de ATP por meio da ATP-sintase a partir de ADP e P_i.

$$ADP + P_i + H^+ \leftrightarrows ATP + H_2O$$

Apesar dos esforços realizados, ainda não foram identificados alguns intermediários da cadeia como também certas moléculas chamadas desacoladoras, que impedem a síntese de ATP durante o CMTE. Além disso, a hipótese não explica porque toda a membrana mitocondrial deve estar intacta durante a síntese de ATP.

Além da síntese de ATP, os gradientes de prótons gerados na CMTE são dissipados na produção de calor empregando outra via para os prótons retornarem para a matriz mitocondrial por meio de uma proteína existente nas membranas internas e chamada *proteína desacopladora* (termogenina), principalmente, no tecido adiposo marrom.

A. Teoria quimiosmótica

Nas últimas décadas foram realizados significativos esforços para delinear o mecanismo da fosforilação oxidativa. Muitas hipóteses foram propostas, mas somente uma foi amplamente aceita e tem sido confirmada experimentalmente, a *teoria quimiosmótica* ou *propulsora de prótons* (proposta por Peter Mitchell em 1961) incorporada de elementos de outra proposta, a do *acoplamento conformacional* (1974).

A teoria postula que o transporte de elétrons e a síntese de ATP estão acoplados pelo gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna. Neste modelo, *a energia livre do transporte de elétrons pela cadeia mitocondrial leva ao bombeamento de* H^+ *(prótons) da matriz para o espaço intermembrana, estabelecendo um gradiente eletroquímico de* H^+ (*força próton-motiva, pmf*) *através da membrana mitocondrial interna.* Os H^+ *retornam* para a matriz mitocondrial por meio de canais protéicos específicos formados pela enzima *ATP-sintase* (*ver* adiante) que é composta de duas unidades funcionais, F_o e F_1. A energia livre liberada pelo potencial eletroquímico desse gradiente é utilizada para a síntese de ATP a partir de ADP e P_i. Para cada NADH oxidado na matriz mitocondrial ~2,5 ATP são sintetizados, enquanto ~1,5 ATP são formados por $FADH_2$ oxidado, já que seus elétrons entram na cadeia em $CoQH_2$, depois do primeiro sítio de bombeamento de prótons.

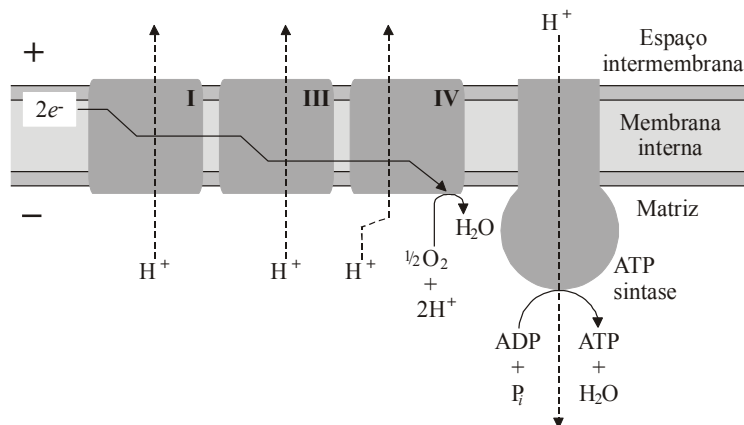



Figura 8.7
Acoplamento do transporte mitocondrial de elétrons e a síntese de ATP (teoria quimiosmótica). O transporte de elétrons movimenta os prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas estabelecendo um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna. O retorno dos prótons para a matriz via F_o–F_1 (ATP-sintase) e a geração de ATP é mostrada à esquerda da figura. A energia também é utilizada na translocação do Ca^{2+}.

B. Síntese de ATP

O acoplamento entre o transporte de elétrons e a síntese de ATP é obtido pelo gradiente eletroquímico. A síntese do ATP na mitocôndria é catalisada pelo complexo *ATP–sintase* (*ATP–sintase bombeadora de prótons, F_oF_1 ATP–sintase, complexo V*) encontrada na membrana mitocondrial interna. É uma enzima multiprotéica composta por duas subunidades distintas: o F_1 e o F_o. O componente F_1 (fator de acoplamento I) é uma proteína periférica de membrana solúvel em água e formada por cinco diferentes subunidades polipeptídicas na proporção (α_3, β_3, γ, δ e ε). O componente F_o é um complexo proteíco integral de membrana com oito diferentes tipos de subunidades e é insolúvel em água. O F_o é o canal transmembrana que transfere prótons para o sítio ativo da ATP–sintase. A unidade F_1 catalisa a síntese de ATP em três sítios ativos. A porção F_o da ATP sintase é uma proteína integral de membrana formada por três ou quatro subunidades.

Quando o componente F_1 está conectado ao componente F_o, a *ATP–sintase* (F_oF_1–ATPase) catalisa a síntese de ATP. No entanto, quando o componente F_1 é liberado para a matriz mitocondrial ocorre uma ação contrária à sua função normal; ele catalisa a hidrólise do ATP (o reverso da síntese).

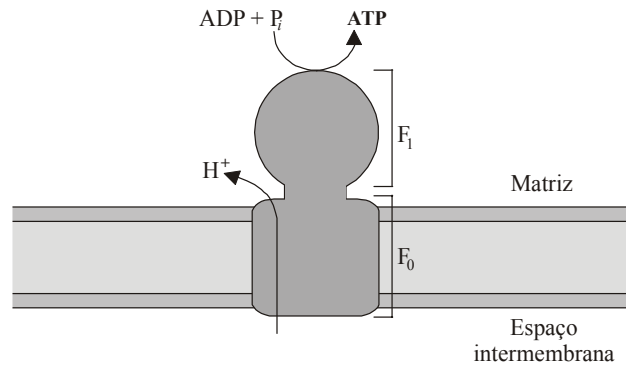



Figura 8.8
Função da ATP–sintase. Os prótons fluem através do canal transmembrana F_0 do espaço intermembrana para a matriz; o componente F_1 catalisa a síntese do ATP a partir do ADP + P_i.

O mecanismo da síntese de ATP a partir de ADP e P_i catalisada pela ATP-sintase foi proposto por Paul Boyer (1979) e consiste de *mecanismo de mudança da ligação* no qual os três sítios de F_1 giram para catalisar a síntese. O mecanismo sugere que a energia não é empregada para formar a ligação fosfoanidro, mas para liberar o ATP do sítio ativo. No sítio ativo, o K_{eq} para a reação ADP + $P_i \leftrightarrows$ ATP + H_2O é perto de 1,0. Assim, a formação de ATP no sítio ativo é rapidamente completada. Contudo, ... Uma mudança conformacional dirigida pelo influxo de prótons enfraquece a ligação do ATP com a enzima e, assim, o ATP recém-sintetizado deixa a superfície da enzima.

A formação e a liberação de ATP ocorre em três etapas:

1. Uma molécula de ADP e uma molécula de P_i ligam-se ao sítio O (aberto).

2. A passagem de prótons para o interior através da membrana mitocondrial interna causa mudanças na conformação dos sítios catalíticos. A conformação aberta (O) – contendo ADP e P_i recentemente ligado – torna-se um sítio frouxo (L). O sítio frouxo, já preenchido com ADP e P_i, torna-se um sítio firme (T). O sítio T contendo ATP converte-se em sítio O (aberto).

3. O ATP é liberado do sítio aberto; o ADP e P_i, condensan-se para formar ATP no sítio firme (T).

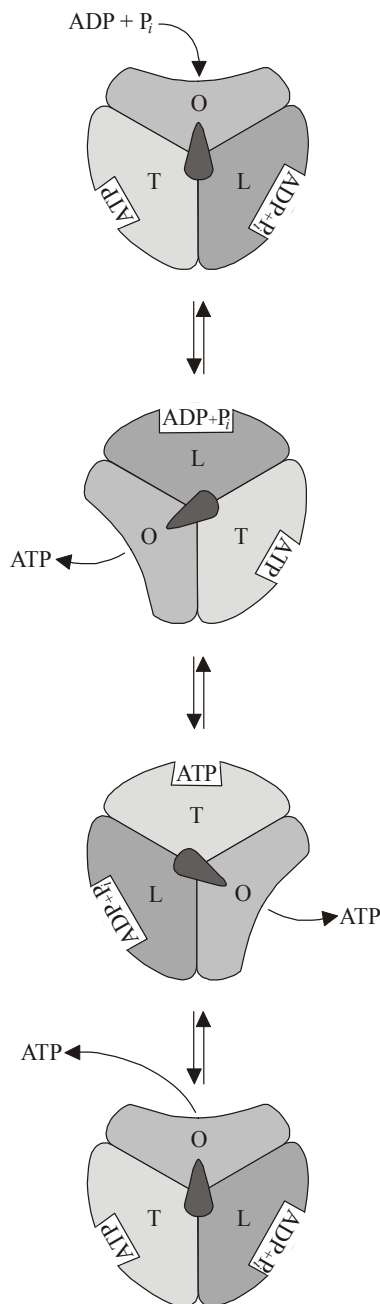



Figura 8.3
Mecanismo de mudança de ligação para ATP-sintase. As diferentes conformações dos três sítios são indicados por diferentes formatos. O ADP e o P_i ligam-se ao sítio O. Uma alteração conformacional dependente de energia liberada na translocação de prótons interconverte os três sítios. O sítio O para L, T para O e O para L. O ATP é sintetizado no sítio T e liberado no sítio O.

C. Transporte ativo do ATP, ADP e P_i através da membrana mitocondrial

É necessário que o ATP recém-sintetizado saia da mitocôndria para a sua utilização no citosol, bem como o retorno do ADP para a produção de ATP na matriz mitocondrial. No entanto, a membrana mitocondrial interna é impermeável a entrada de ADP e a saída de ATP. Para que essas moléculas atravessem a membrana é necessária a

presença da *ATP-ADP–translocase* (*translocador de ADP–ATP*) – uma proteína mitocondrial transportadora de íons e metabólitos carregados – que é impelida pelo potencial de membrana. A difusão dessas moléculas carregadas é realizada por um mecanismo de transporte acoplado, ou seja, a entrada de ADP na matriz está vinculada a saída de ATP, e vice-versa (sistema de *antiporte*). O segundo sistema de transporte de membrana é a *fosfato–translocase*, que promove a entrada de um P_i e um H^+ (próton) para o interior da matriz (sistema de *simporte* P_i–H^+), que atua em conjunto com a ATP–ADP-translocase. A ação combinada desses dois transportadores promove a troca do ADP e P_i citosólicos pelo ATP da matriz mitocondrial com o *ganho líquido de um* H^+ no espaço intermembrana.

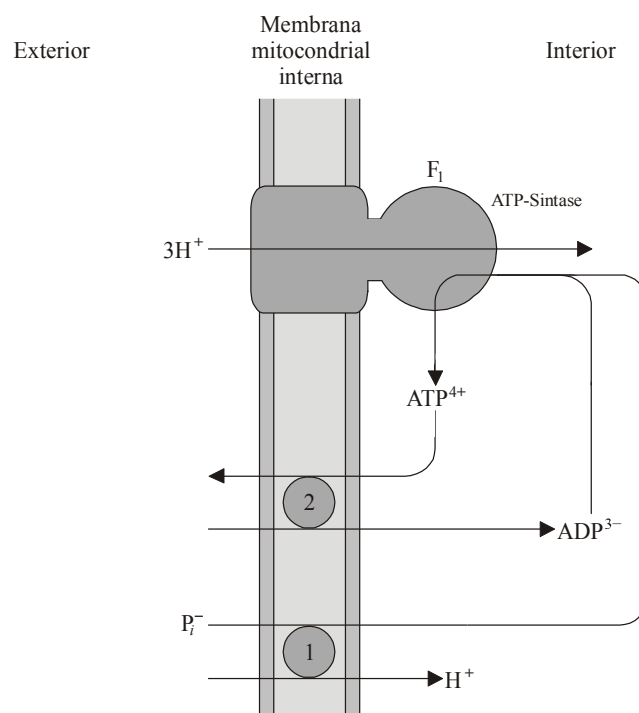



Figura 8.11
Transporte de ATP, ADP e P_i através da membrana mitocondrial interna. A ATP–ADP–translocase (translocador de ADP–ATP) transporta o ATP recém-sintetizado para o cotosol e ADP e P_i para dentro da matriz (antiporte). Notar que a troca de P_i e H^+ é simporte. (1) Fosfato-translocase e (2) ATP-ADP-translocase.

A troca ATP-ADP gasta 25% do rendimento energético da transferência de elétrons na cadeia mitocondrial para regenerar o potencial de membrana.

D. Número de ATP gerados via cadeia mitocondrial transportadora de elétrons

A relação precisa entre o número de prótons que retornam para a matriz mitocondrial através da F_1–F_o–ATP sintase e o número de ATP gerados permance incerto. Existe o consenso de que três prótons

voltam para a matriz para cada ATP gerado. Também acredita-se que o par de elétrons que entra na cadeia transportadora a partir do:

- *NADH* através dos Complexos I, III e IV resulta na translocação de 10 prótons (as estimativas variam entre 9 e 12 prótons) para o espaço intermembrana. O retorno desses 10 prótons por meio da ATP-sintase promove a síntese de ~2,5 ATP.
- *$FADH_2$* que se oxida no complexo II sem passar pelo Complexo I, transloca seis elétrons para o espaço intermembrana. O retorno desses 6 prótons por meio da ATP-sintase sintetiza ~1,5 ATP.

A *razão P/O* é uma medida do número de ATP sintetizados por átomo de oxigênio utilizado, ou por mol de água produzida. Estudos recentes confirmaram os valores (2,5 e 1,5) para a razão P/O e, portanto, não correspondem aos valores anteriormente usados (3 e 2, respectivamente). O transporte do fosfato para a matriz resulta em um ganho líquido de um próton. Desse modo, assumindo que 10 prótons são bombeados para fora da matriz mitocondrial e quatro prótons retornam para cada ATP sintetizado, 10/4 moléculas de ATP são produzidas para cada dois elétrons liberados do NADH para O_2 na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons. Cálculo similar mostra que 6/4 moléculas de ATP são produzidas por elétrons emanados do $FADH_2$.

E. Regulação da fosforilação oxidativa

A velocidade do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa são controlados estritamente pelas necessidades energéticas da célula. O controle pelo ADP é ilustrado pelo fato que a mitocôndria só oxida o NADH e o $FADH_2$ quando houver disponibilidade de ADP e P_i como substratos para a fosforilação Os elétrons não fluem pela CMTE até o oxigênio, a menos que o ADP seja simultaneamente fosforilado a ATP. A velocidade da fosforilação oxidativa é limitada pelo quociente de ação das massas [ATP]/[ADP][P_i]. Ou seja, a ATP-sintase é inibida em altas concentrações de ATP e ativada quando as concentrações de ADP e P_i estão elevadas. A ATP−sintase é inibida por altas concentrações de ATP e ativada por teores de ADP e P_i elevados. As quantidades relativas de ATP e ADP intramitocondrial são controladas por duas proteínas transportadoras presentes na membrana interna: o translocador de ADP−ATP e o carreador de fosfato (*ver* acima).

O *translocador de ADP−ATP* é uma proteína dimérica responsável pela troca 1:1 do ATP intramitocondrial pelo ADP citoplasmático. Como o ATP possui uma carga negativa a mais que o ADP, o transporte do ATP para o exterior e do ADP para o interior da mitocôndria são favorecidas. O transporte de $H_2PO_4^-$ junto com um próton é mediada pela fosfato-translocase, também conhecida como $H_2PO_4^-/H^+$ simporte (movem solutos através da membrana na mesma direção). O transporte de 4 prótons para o interior é necessário para a síntese de cada moléula de ATP; 3 para dirigir o rotor ATP-sintase e 1 para dirigir o transporte do fosfato para o interior.

F. Desacopladores da fosforilação oxidativa

Os desacopladores da fosforilação oxidativa são substâncias presentes na membrana mitocondrial interna que dissipam o gradiente

de prótons ao trazerem novamente os prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial, contornando a ATP−sintase. Aumentam a permeabilidade dos H^+ e são capazes de dissociar a fosforilação oxidativa do transporte de elétrons.

Quadro 8.1 – Alguns inibidores que interferem com a fosforilação oxidativa.

Sítio de inibição	Agente
Transporte de elétrons	Rotenona
	Amital
	Antimicina A
	Monóxido de carbono (CO)
	Cianeto
	Azida sódica
	Piercidina A
Membrana interna	2,4-dinitrofenol (DNP)
	Valinomicina
ATP-sintase	Oligomicina
	Venturicidina
	Proteína desacopladora (termogenina)

G. Desacoplamento do transporte de elétrons e termogênese

Recém-nascidos, animais que hibernam e animais adaptados ao frio necessitam maior produção de energia que a normalmente produzida pelo metabolismo. Os animais de sangue quente usam o calor para manter a temperatura do corpo. Sob condições normais, o transporte de elétrons e a síntese de ATP estão intimamente acoplados de tal forma que o calor produzido é mantido ao mínimo. No *tecido adiposo marrom*, a maior parte da energia produzida pela CMTE não é empregada para formar ATP. Em lugar disso, ela é dissipada como calor. (Esse tecido tem cor marrom devido ao grande número de mitocôndrias que contêm). Ao redor de 10% da proteína na membrana mitocondrial interna é constituída de *termogenina* ou *proteína desacopladora* que permite que os prótons retornem à matriz sem passar pelo complexo F_oF_1. Desse modo, quando a termogenina está ativa, a energia de oxidação não é conservada na forma de ATP mas é dissipada como calor. A proteína desacopladora é ativada quando ela se liga a ácidos graxos.

O processo de geração de calor na gordura marrom, chamado *termogênese sem tremor,* é regulado pela noradrenalina (na termogênese com tremor, o calor é produzido pela contração muscular involuntária). A noradrenalina, um neurotransmissor liberado por neurônios especializados que terminam no tecido adiposo marrom, inicia um mecanismo de cascata que hidroliza moléculas de gordura. Os ácidos graxos produzidos por hidrólise das gorduras ativam a proteína desacopladora. A oxidação de ácidos graxos continua até cessar o sinal de noradrenalina ou até que as reservas de gorduram acabem.

H. Transporte de elétrons do citosol para a mitocôndria

O NADH produzido na glicólise (na oxidação do gliceraldeído−3−fosfato), não pode ser utilizado diretamente pela cadeia mitocondrial transportadora de elétrons para a formação de ATP. Como a geração de NADH (equivalente reduzido) ocorre no citosol e a membrana mitocondrial interna é impermeável a essa substância, é possível transportar somente os elétrons do NADH para a mitocôndria por um dos sistemas de circuitos, tais como, *circuito do glicerol−fosfato* e o *circuito do malato−aspartato.*

1. Lançadeira do glicerol-fosfato. Está presente nos músculos e cérebro dos mamíferos, e emprega a enzima *3−fosfoglicerol−desidrogenase* que catalisa a redução da diidroxiacetona fosfato pelo NADH para originar *3−fosfoglicerol*. O 3−fosfoglicerol difunde-se até a face externa da membrana mitocondrial interna onde localiza-se uma outra 3−fosfoglicerol−desidrogenase que contém FAD. A diidroxiacetona fosfato é regenerada a partir da 3−fosfoglicerol formando $FADH_2$. O $FADH_2$ entrega seus elétrons à coenzima Q para seguir a seqüência da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons. Para cada NADH citosólico oxidado resulta apenas 1,5 ATP. A diidroxiacetona−fosfato é, então, transferida de volta para o citosol.

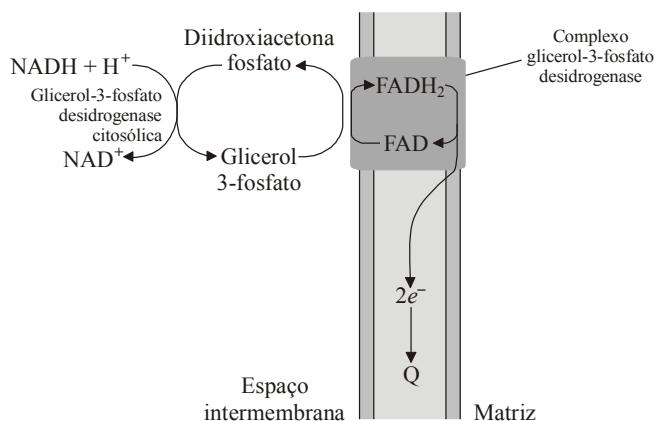



Figura 8.12
Circuito (lançadeira) glicerol-fosfato. O NADH citosólico reduz a diidroxiacetona-fosfato a glicerol−3−fosfato em reação catalisada pela glicerol−3−fosfato-desidrogenase citosólica. A reação reversa emprega uma flavoproteína ligada à superfície externa da membrana interna que transfere os elétrons para a coenzima Q (ubiquinona).

2. Lançadeira do malato-aspartato. Está disponível nas células hepáticas, cardíacas e renais e de outros tecidos. Nesse sistema, o NADH citosólico reduz o oxaloacetato a malato pela *malato−desidrogenase* extramitocondrial. O malato transpõe a membrana mitocondrial interna onde é reoxidado a oxaloacetato pela malato desidrogenase mitocondrial que utiliza o NAD^+ como coenzima. Pela reoxidação do malato na matriz, ocorre a transferência dos equivalentes reduzidos provenientes do citosol. O oxalacetato formado é transformado em aspartato que pode atravessar a membrana. Este sai da mitocôndria e, no citosol, regenera o

oxaloacetato. O NADH regenerado na mitocôndria transfere os elétrons para a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, onde forma ATP.

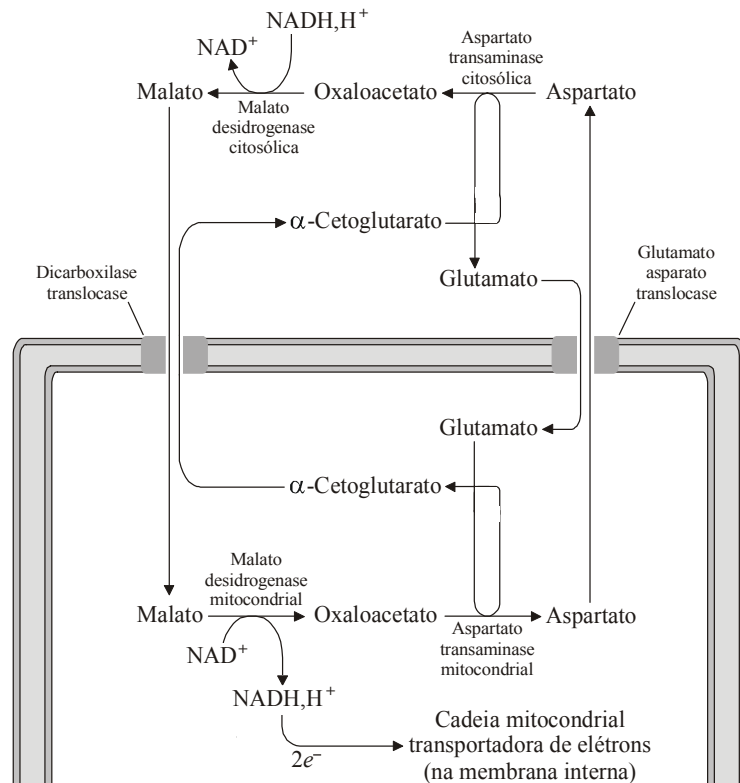



Figura 8.13
Circuito do malato-aspartato. O NADH citosólico reduz o oxaloacetato a malato., que é transportado através da membrana interna para a matriz mitocondrial. A reoxidação do malato gera NADH que transfere os elétrons para a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons.

A operação contínua do circuito necessita o retorno do oxaloacetato para o citosol. O oxaloacetato citosólico é regenerado por meio de reações de transaminação tanto mitocondriais como citosólicas.

Todos os tecidos que possuem mitocôndria, parecem ter a carreadores que atravessam a membrana. A proporção de cada *lançadeira* varia para cada tecido. O fígado utiliza, principalmente, a malato-aspartato, enquanto certas células musculares são mais dependentes do circuito do glicerol-fosfato.

8.5 Rendimento da oxidação completa da glicose

Cada molécula de glicose completamente oxidada a CO_2 e H_2O pelas vias da glicólise, ciclo do ácido cítrico e cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, utilizando o circuíto malato/aspartato (*ver* Capítulo 6: Metabolismo dos carboidratos) gera 32 moléculas de ATP (Tabela 8.3) aceitando os novos valores para a relação P/O (*ver*

acima). Os valores anteriormente usados para o rendimento de ATP pela oxidação completa da glicose é 38 ATP.

Tabela 8.3 – Balanço de ATP formados pela completa oxidação da glicose a CO_2 na glicólise e no ciclo do ácido cítrico

Reações	**ATP/mol**
Fosforilação da glicose	−1
Fosforilação da glicose 6−fosfato	−1
2 (desfosforilação do 1,3−bifosfoglicerato)	+2
2 (desfosforilação do fosfoenolpiruvato)	+2
2 x 1 NADH (oxidação do gliceraldeido 3−fosfato)	+5
2 x 1 NADH (descarboxilação oxidativa do piruvato)	+5
2 x 3 NADH (ciclo do ácido cítrico)	+15
2 x 1 $FADH_2$ (ciclo do ácido cítrico)	+3
2 x 1 GTP (ciclo do ácido cítrico)	+2
Total	+31

A utilização do circuíto glicerol-fosfato encontrada no músculo esquelético e no cérebro, apenas 30ATP são formados.

A oxidação da glicose a CO_2 e H_2O, libera −2870 kJ·mol^{-1}. A energia livre padrão necessária para sintetizar 1 mol de ATP a partir de ADP e P_i é 30,5 kJ·mol^{-1} A energia livre para a síntese de 32 ATP corresponde a 32 x 30,5 = −976 kJ·mol^{-1}. A eficiência termodinâmica de formação de ATP a partir da glicose é 976 x 100/2870 = 34%. Assim, aproximadamente 34% da energia liberada na completa oxidação da glicose é conservada como ATP.

8.6 Estresse oxidativo

Algumas vezes, o oxigênio pode aceitar elétrons para formar derivados instáveis, conhecidos como *espécies reativas de oxigênio* (ROS) que incluem o *radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e singlet oxigen.* Como os ROS reagem facilmente com vários componentes celulares, a sua ação pode lesar células de modo significante. Nos organismos vivos, a formação de ROS é geralmente mantida em quantidades mínimas por mecanismos antioxidantes. (Antioxidantes são substâncias que inibem a reação de moléculas com radicais oxigênio).

Em certas ocasiões, denominadas coletivamente como *estresse oxidativo,* os mecanismos antioxidantes são contornados com a ocorrência de lesão oxidativa. A lesão ocorre principalmente por inativação enzimática, despolimerização polissacarídica, lesões oxidativas no DNA e rompimento das membranas biológicas. Exemplos de circunstâncias que podem causar sérias lesões oxidativas incluem certas anormalidades metabólicas, o consumo exagerado de certos fármacos, a exposição a radiação intensa e contato repetitivo com certos contaminates ambientais (exemplo, fumaça de cigarro).

Além da contribuição aos processos de envelhecimento, a lesão oxidativa foi relacionada a um grande número de doenças, entre as

quais estão câncer, desordens cardiovasculares (aterosclerose, infarto do miocárdio, hipertensão), desordens neurológicas como a esclerose amiotrófica lateral (ALS; doença de Lou Gehring), doença de Parkinson, doença de Alzheimer. Vários tipos de células deliberadamente produzem grandes quantidades de ROS. Por exemplo, os macrófagos e neutrófilos continuamente atuam buscando microrganismos e células lesionadas.

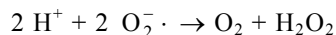
A. Espécies reativas de oxigênio

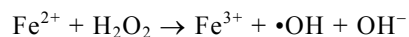
As propriedades do oxigênio estão diretamente relacionadas com sua estrutura molecular. A molécula de oxigênio diatômica é um diradical. Um radical é um átomo ou grupo de átomos que contêm um ou mais elétrons não-emparelhados. Dioxigênio é um diradical porque possui dois elétrons não-emparelhados. Por essa e outras razões, quando reage, o dioxigênio pode aceitar somente um elétron por vez.

Relembrando que na sequência da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, a H_2O é formada como resultado da transferência seqüencial de 4 elétrons para o O_2. Durante o processo, vários ROS são formados. A citocromo−oxidase captura os intermediários reativos em seu sítio ativo até que todos os 4 elétrons tenham sido transferidos para o oxigênio. Entretanto, os elétrons podem escapar da via de transporte de elétrons e reagir com o O_2 para formar ROS.

Sob circunstâncias normais, os mecanismos antioxidantes de defesa celular miniminizam as lesões. ROS também são formados durante processos não−enzimáticos. Por exemplo, a exposição à luz ultravioleta e a radiação ionizante causam a formação de ROS.

O primeiro ROS formado durante a oxidação do oxigênio é o radical superóxido ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^- \cdot$). A maioria dos radicais superóxidos são produzidos na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons pelos elétrons derivados do ciclo Q no complexo III e pela flavina NADH−desidrogenase (complexo I). O radical superóxido atua como nucleófilo e (sob condições específicas) tanto como agente oxidante como agente redutor. Devido as suas propriedades de solubilidade, o $O_2^- \cdot$ causa considerável lesões oxidativas aos componentes fosfolipídicos da membrana. Quando gerado em meio aquoso, o $O_2^- \cdot$ reage consigo mesmo para formar O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2):

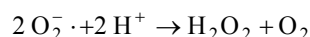
$$2\ H^+ + 2\ O_2^- \cdot \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

O H_2O_2 não é um radical pois não possui nenhum elétron desemparelhado. A limitada reatividade do H_2O_2 permite a sua passagem através de membranas e torna-se grandemente disperso. A reação subseqüente do H_2O_2 com o o Fe^{2+} (ou outro metal de transição) resulta na produção do radical hidroxila, uma espécie altamente reativa.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$$

Radicais como o radical hidroxila são especialmente perigosos porque podem iniciar reações autocatalíticas.

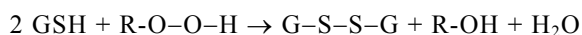
B. Mecanismos enzimáticos antioxidantes

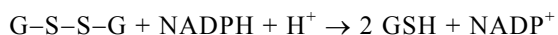
As principais defesas enzimáticas contra o estresse oxidativo são: a superóxido–dismutase, o glutationa–peroxidase e a catalase. A ampla distribição celular dessas enzimas previne a ação de espécies de oxigênio reativas.

1. Superóxido-dismutase (SOD). É uma classe de enzimas que cataliza a formação de H_2O_2 e O_2 a partir do radical superóxido:

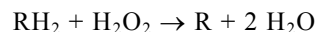
$$2\,O_2^{-}\cdot + 2\,H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Existem duas formas principais de SOD. Em humanos ocorre no citoplasma a isoenzima Cu–Zn. Uma isoenzima contendo Mn é encontrada na matriz mitocondrial. A doença de Lou Gehring (esclerose amiotrófica lateral), uma condição degenerativa fatal na qual ocorre a degeneração neuromotora, é causada por mutação no gene que codifica a isoenzima Cu–Zn citosólica da SOD.

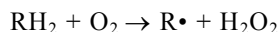
2. Glutationa–peroxidase. É uma enzima chave no sistema responsável pelo controle dos níveis de peroxidase celular. A enzima contém selênio e A enzima catalisa a redução de várias substâncias pelo agente redutor glutationa (GSH). Além da redução do H_2O_2 pera formar água, a glutationa-peroxidase transforma peróxidos orgânicos em álcoois:

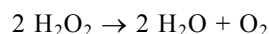
$$2\ GSH + R\text{-}O\text{–}O\text{–}H \rightarrow G\text{–}S\text{–}S\text{–}G + R\text{-}OH + H_2O$$

Várias enzimas auxiliares mantêm a função da glutationa-peroxidase. A GSH é regenerada a partir do GSSG (glutationa-dissulfeto) pela glutationa-redutase:

$$G\text{–}S\text{–}S\text{–}G + NADPH + H^{+} \rightarrow 2\ GSH + NADP^{+}$$

O NADPH necessário para a reação é fornecido principalmente pela via das pentoses-fosfato (*ver* Capítulo 6: Metabolismo dos carboidratos). O NADPH também é produzido por reações catalisadas pela isocitrato-desidrogenase e pela enzima málica.

3. Catalase. É uma enzima contendo heme que emprega o H_2O_2 para oxidar outros substratos:

$$RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2\ H_2O$$

Quantidades abundantes de catalase são encontradas nos peroxissomos, ricos em H_2O_2 gerados em várias reações:

$$RH_2 + O_2 \rightarrow R\bullet + H_2O_2$$

O excesso de H_2O_2 é convertido em água pela catalase:

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

C. Moléculas antioxidantes

Os organismos vivos usam moléculas antioxidantes para se autoproteger dos radicais. Alguns dos mais proeminentes incluem a glutationa (GSH), o α–tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) e o β–caroteno.

Resumo

1. A maioria das reações que captam ou liberam energia são reações de oxidação-redução. Nessas reações, os elétrons são transferidos entre o doador de elétrons (agente redutor) e o aceptor de elétrons (agente oxidante). Em algumas reações, somente os elétrons são transferidos; em outras, tanto os elétrons como os prótons são transferidos. A tendência de um par redox conjungado em perder um elétron é chamado potencial redox. Os elétrons fluem espontaneamente do par redox eletronegativo para o mais positivo. Nas reações redox favoráveis o $\Delta E^{\circ\prime}$ é positivo e $\Delta G^{\circ\prime}$ é negativo.
2. O oxigênio é empregado pelos organismos aeróbicos como aceptor terminal de elétrons na geração de energia. Várias propriedades físicas e químicas o tornam capaz desse papel. Além de sua disponibilidade, o oxigênio difunde facilmente através das membranas celulares e facilmente aceita elétrons.
3. As moléculas de NADH e $FADH_2$ produzidas na glicólise, β-oxidação dos ácidos graxos, oxidação de alguns aminoácidos e ciclo do ácido cítrico geram energia na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons. A via consiste de uma série de carreadores redox que recebem elétrons do NADH e $FADH_2$. No final do caminho os elétrons, juntamente com os prótons são doados para o oxigênio para formar H_2O.
4. Durante a oxidação de NADH, existem três etapas na quais a energia liberada é suficiente para sintetizar ATP. São elas: as etapas I, III e IV.
5. A fosforilação oxidativa é o mecanismo no qual o transporte de elétrons está acoplado para a síntese de ATP. De acordo com a teoria quimiosmótica, a criação de um gradiente de prótons que acompanha o transporte de elétrons está acoplado a síntese de ATP.
6. A completa oxidação de uma molécula de glicose resulta na síntese de 29,5 a 31 ATP, dependendo do circuito (lançadeira) de elétrons utilizado, o circuito glicerol-fosfato ou o circuito malato-aspartato, para transferir os elétrons do NADH citoplasmático para a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons.
7. O uso de oxigênio pelos organismos aeróbicos relaciona-se com a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio). O ROS é formado porque as moléculas de diradical de oxigênio aceita um elétron por vez. Exemplos de ROS incluem o radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e *singlet oxigen*. O risco da presença de elevado conteúdo de ROS é mantido ao mínimo por mecanismos celulares de defesa antioxidante.

Referências

McKEE, T., McKEE, J.R. **Biochemistry:** The molecular basis of life. 3 ed. Boston: McGraw-Hill, 2003. p. 298-330.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger:** Princípios de bioquímica. 3 ed. São Paulo : Sarvier, 2002. p. 515-62.

STRYER, L. **Bioquímica.** 4 ed. Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 1996. p. 502-28.

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica.** Porto Alegre : Artmed, 2000. p. 492-528.

VALTER T. MOTTA

BIOQUÍMICA BÁSICA

Lipídeos e Membranas

9

Lipídeos e Membranas

Objetivos

1. Compreender as estruturas dos principais lipídeos.
2. Descrever os fatores que influenciam os pontos de fusão dos ácidos graxos.
3. Descrever os diferentes lipídeos presentes nas membranas.
4. Descrever as diferentes proteínas de membrana.
5. Compreender o modelo do mosaico fluído e seus refinamentos.
6. Compreender que a distribuição de íons em cada lado da membrana gera um potencial de membrana.
7. Compreender os mecanismos de transporte através das membranas.
8. Compreender as modificações na bicamada que ocorrem durante a endocitose e da exocitose.

Os lipídeos são biomoléculas que exibem uma grande variedade estrutural. Moléculas como as gorduras e óleos, fosfolipídeos, esteróides e carotenóides, que diferem grandemente tanto em suas estruturas como em suas funções são considerados lipídeos. São compostos orgânicos heterogêneos pouco solúveis em água, mas solúveis em solventes não-polares. Alguns lipídeos estão combinados com outras classes de compostos, tais como proteínas (lipoproteínas) e carboidratos (glicolipídeos).

Os lipídeos participam como componentes não-protéicos das membranas biológicas, precursores de compostos essenciais, agentes emulsificantes, isolantes, vitaminas (A, D, E, K), fonte e transporte de combustível metabólico, além de componentes de biossinalização intra e intercelulares.

9.1 Classificação dos lipídeos

Os lipídeos são freqüentemente classificados nos seguintes grupos:

- Ácidos graxos e seus derivados
- Triacilgliceróis.
- Ceras

- Fosfolipídeos (glicerofosfolipídeos e esfingosinas)
- Esfingolipídeos (contêm moléculas do aminoálcool esfingosina)
- Isoprenóides (moléculas formadas por unidades repetidas de isopreno, um hidrocarboneto ramificado de cinco carbonos) constituem os esteróides, vitaminas lipídicas e terpenos.

A. Ácidos graxos e seus derivados

Os ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos de longas cadeias de hidrocarbonetos acíclicas, não-polares, sem ramificações e, em geral, número par de átomos de carbono. Podem ser *saturados*, *monoinsaturados* (contém uma ligação dupla) ou *poliinsaturados* (contêm duas ou mais ligações duplas). Os mais abundantes contêm C_{16} e C_{18} átomos. Em geral, as duplas ligações nos ácidos graxos poliinsaturados estão separadas por um grupo metileno, $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$, para evitar a oxidação quando expostos em meio contendo oxigênio. Como as ligações duplas são estruturas rígidas, as moléculas que as contêm podem ocorrer sob duas formas isoméricas: *cis* e *trans*. Os isômeros *cis* ocorrem na maioria dos ácidos graxos naturais. Os ácidos graxos são componentes importantes de vários tipos de moléculas lipídicas. As estruturas e nomes de alguns ácidos graxos estão ilustrados na Tabela 9.1. Em geral, são representados por um símbolo numérico que designa o comprimento da cadeia. Os átomos são numerados a partir do carbono da carboxila. A numeração 16:0 designa um ácido graxo com C_{16} sem ligações duplas, enquanto $16{:}1^{\Delta 9}$ representa um ácido graxo com C_{16} e ligação dupla em C9. Os átomos C2 e C3 dos ácidos graxos são designados α e β, respectivamente.

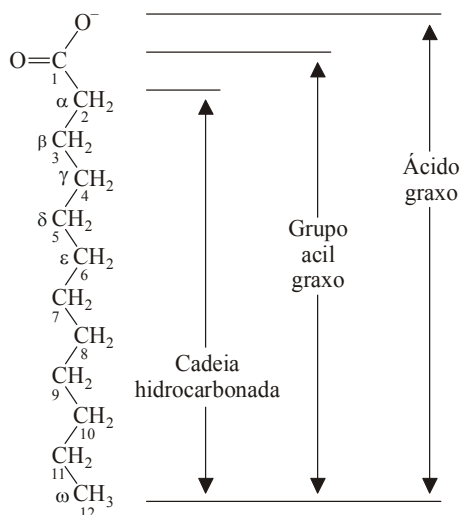



Figura 9.1
Estrutura e nomenclatura dos ácidos graxos. Os ácidos graxos consistem de uma longa cauda hidrocarbonada e um terminal com um grupo carboxílico. Na nomenclatura IUPAC, os carbonos são numerados a partir do carbono carboxílico. Na nomenclatura comum, o átomo de carbono adjacente ao carbono carboxílico é designado α, e os carbonos seguintes são nomeados β, γ, δ, etc. O átomo de carbono mais distante do carbono carboxílico é chamado carbono ω, independente do tamanho da cadeia. O ácido graxo mostrado, laureato (ou dodecanoato), tem 12 carbonos e não

contêm duplas ligações.

Outro sistema de numeração também é utilizado na nomenclatura dos ácidos graxos onde o C1 é o mais distante do grupo carboxila (sistema de numeração ω *ômega*):

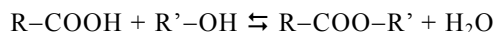
Tabela 9.1 – Alguns ácidos graxos de ocorrência natural

Símbolo numérico	Estrutura	Nome comum
Ácidos graxos saturados		
12:0	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	Ácido láurico
14:0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	Ácido mirístico
16:0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	Ácido palmítico
18:0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	Ácido esteárico
20:0	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	Ácido araquídico
22:0	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	Ácido beênico
24:0	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	Ácido lignocérico
Ácidos graxos insaturados		
$16{:}1^{\Delta 9}$	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido palmitoléico
$18{:}1^{\Delta 9}$	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido oléico
$18{:}2^{\Delta 9,\ 12}$	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido linoléico
$18{:}3^{\Delta 9,\ 12,\ 15}$	$CH_3\text{-}(CH_2\text{-}CH{=}CH)_3(CH_2)_7COOH$	Ácido α-linolêico
$20{:}4^{\Delta 5,\ 8,\ 11,\ 14}$	$CH_3\text{-}(CH_2)_3\text{-}(CH_2\text{-}CH{=}CH)_4\text{-}(CH_2)_3COOH$	Ácido araquidônico

Além das gorduras provenientes da dieta, o homem pode sintetizar a maioria dos ácidos graxos, mas é incapaz de produzir o ácido linoléico e o ácido linolênico. Esses dois últimos são denominados *ácidos graxos essenciais* e são obtidos da dieta. Os ácidos graxos essenciais são precursores para a biossíntese de vários metabólitos importantes. A dermatite é um sintoma precoce em indivíduos com dietas pobres em ácidos graxos essenciais. Outros sinais da deficiência incluem demora na cura de ferimentos, reduzida resistência a infecções, alopecia (perda de cabelo) e trombocitopenia (redução do número de plaquetas, um componente essencial nos processos de coagulação sangüínea).

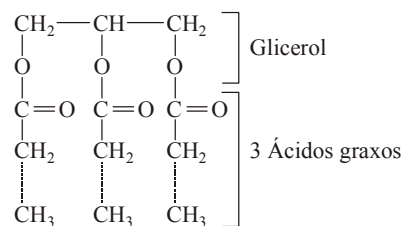
Os pontos de fusão dos ácidos graxos elevam com o aumento do comprimento da cadeia hidrocarbonada. Os ácidos graxos saturados com dez ou mais átomos de carbono são sólidos em temperatura ambiente. Todos os insaturados são líquidos nesta temperatura.

Uma das mais importantes reações dos ácidos graxos é a formação de ésteres:

$$R{-}COOH + R'{-}OH \leftrightarrows R{-}COO{-}R' + H_2O$$

Essa reação é reversível; ou seja, sob condições favoráveis um éster de ácido graxo pode reagir com a água para formar um ácido graxo e um álcool.

B. Triacilgliceróis

Os triacilgliceróis (triglicerídeos) são ésteres de ácidos graxos com o glicerol. A porção ácido graxo presente nos ésteres lipídicos é designada grupo *acila.* Dependendo do número de grupos hidroxila do glicerol esterificados com ácidos graxos, os acilgliceróis são denominados *monoacilgliceróis, diacilgliceróis* e *triacilgliceróis.* Estes compostos são também conhecidos como mono–, di– e triglicerídeos. São os lipídeos mais abundantes no transporte e armazenamento de ácidos graxos. Os ácidos graxos presentes nos triacilgliceróis naturais podem ser iguais (triacilgliceróis *simples*) ou diferentes (triacilgliceróis *mistos*).

```
CH2──CH──CH2  ┐
|    |    |   │ Glicerol
O    O    O   ┘
|    |    |
C=O  C=O  C=O ┐
|    |    |   │
CH2  CH2  CH2 │ 3 Ácidos graxos
:    :    :   │
CH3  CH3  CH3 ┘
```

Triacilglicerol

A maioria dos ácidos graxos presentes nos triacilgliceróis são mono ou poliinsaturados em configuração *cis*. O ponto de fusão desses compostos é determinado, fundamentalmente, pela natureza dos ácidos graxos presentes na molécula.

Em animais, os triacilgliceróis (geralmente chamados de gorduras) têm vários papéis. Primeiro, são as principais formas de armazenamento e transporte de ácidos graxos. As moléculas de triacilgliceróis armazenam energia mais eficientemente que o glicogênio por várias razões:

- Os triacilgliceróis hidrofóbicos são armazenados na forma de gotículas de gordura não hidratadas em células do tecido adiposo. O glicogênio (outra molécula de armazenamento de energia) liga-se com substancial quantidade de água de hidratação (2 gramas de água por grama de glicogênio). Assim, os triacilgliceróis armazenam uma quantidade muito maior de energia que o glicogênio hidratado.
- As moléculas de triacilgliceróis são mais reduzidas que as dos carboidratos e, desse modo, sua oxidação libera o dobro em energia que a oxidação dos açúcares, ou seja, 38,9 $kJ \cdot g^{-1}$ (gordura) e 17,2 $kJ \cdot g^{-1}$ (açúcares).

Segunda importante função da gordura é o isolamento térmico contra baixas temperaturas, pois é uma pobre condutora de calor. Como o tecido adiposo, com seu elevado conteúdo de triacilgliceróis, é encontrado na camada subcutânea previne a perda de calor.

Nas plantas, os triacilgliceróis constituem uma importante reserva de energia em frutas e sementes. Como essas moléculas contêm consideráveis quantidades de ácidos graxos insaturados (exemplos, oléico e linoléico) são chamados óleos vegetais. Sementes ricas em óleos incluem amendoim, milho, açafrão e feijão de soja. Abacate e azeitonas são frutas com alto conteúdo em gorduras.

C. Ceras

As ceras são misturas complexas de lipídeos não-polares. Funcionam como um revestimento de proteção em folhas, caules, frutos e na pele de animais. Os ésteres são compostos de ácidos graxos de cadeia longa e álcoois de cadeia longa como constituintes proeminentes da maioria das ceras. Exemplos bem conhecidos de ceras incluem a cera de carnaúba e a cera de abelha. O constituinte principal da cera de carnaúba é o éster de melissil ceronato. O triacontanoil palmitato é o principal componente da cera de abelha. As ceras também contêm hidrocarbonetos, álcoois, ácidos graxos, aldeídos e esteróis (álcoois esteróides).

D. Fosfolipídeos

Os fosfolipídeos são os principais componentes lipídicos estruturais das membranas. Além disso, vários fosfolipídeos são agentes emulsificantes (composto que promove a dispersão coloidal de um líquido em outro) e agentes surfactantes (composto que reduz a tensão superficial de uma solução, como detergentes). Os fosfolipídeos exercem essas funções por serem moléculas anfifílicas. Apesar das diferenças estruturais, todos os fosfolipídeos são constituídos de "caudas" apolares alifáticas de ácidos graxos e "cabeças" polares que contêm fosfato e outros grupos carregados ou polares.

Quando em concentrações apropriadas, os fosfolopídeos suspensos em água se organizam em estruturas ordenadas na forma de micelas ou bicamadas lipídicas (*ver* seção 9.3.A).

Existem dois tipos de fosfolipídeos: os glicerofosfolipídeos e as esfingomielinas.

1. Glicerofosfolipídeos ou fosfoglicerídeos. São moléculas que contêm um glicerol, dois ácidos graxos de cadeia longa, um fosfato e um álcool (exemplo, colina). São os principais componentes lipídicos das membranas celulares. O ácido fosfatídico (1,2−diacilglicerol−3−fosfato) é o composto, o precursor de outras moléculas de glicerofosfolipídeos, consiste de glicerol−3−fosfato, cujas posições C1 e C2 são esterificadas com ácidos graxos.

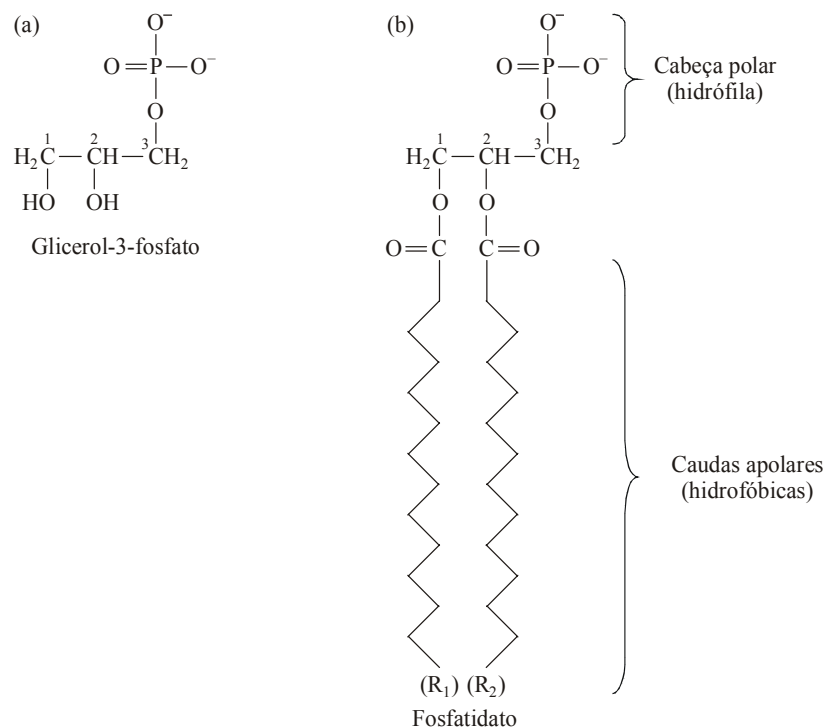
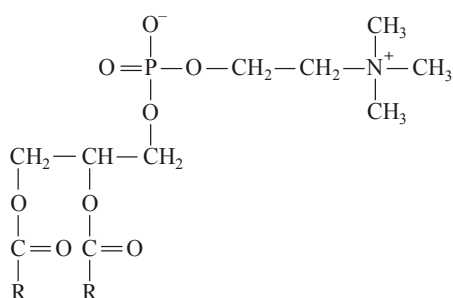



Figura 9.2
Glicerofosfolipídeos. (a) Glicerol–3–fosfato e (b) fosfatidato. O fosfatidato consiste de glicerol–3–fosfato com dois grupos acil graxo (R_1 e R_2) esterificado nos grupos hidroxila em C1 e C2.

Os glicerofosfolipídeos são classificados de acordo com o álcool esterificado ao grupo fosfato. Alguns dos mais importantes são: *fosfatidilcolina* (lecitina), *fosfatidiletanolamina* (cefalina), *fosfatidilglicerol* e *fosfatidilserina*.

Os ácidos graxos frequentemente encontrados nos glicerofosfolipídeos tem entre 16 e 20 átomos de carbono. Os ácidos graxos saturados ocorrem geralmente no C1 do glicerol. A posição C2 do glicerol é freqüentemente ocupada por ácidos graxos insaturados. Um derivado do fosfoinositol denominado *fosfatidil–4,5–bifosfato* (PIP_2), é encontrado em pequenas quantidades nas membranas e é um importante componente na transdução de sinal. O *sistema do fosfoinositídeo* iniciado quando certos hormônios ligam-se aos receptores específicos na superfície externa das membranas plasmáticas, é descrito no Capítulo 12: Regulação do metabolismo energético.

```
            O⁻                  CH3
            |                   |
      O ═ P — O — CH2 — CH2 — N⁺ — CH3
            |                   |
            O                   CH3
            |
CH2 — CH — CH2
|      |
O      O
|      |
C═O  C═O
|      |
R      R
```

Fosfatidilcolina

```
            O⁻
            |
      O ═ P — O — CH2 — CH2 — N⁺H3
            |
            O
            |
CH2 — CH — CH2
|      |
O      O
|      |
C═O  C═O
|      |
R      R
```

Fosfatidiletanolamina

```
            O⁻
            |
      O ═ P — O — CH2 — CH — CH2OH
            |            |
            O            OH
            |
CH2 — CH — CH2
|      |
O      O
|      |
C═O  C═O
|      |
R      R
```

Fosfatidilglicerol

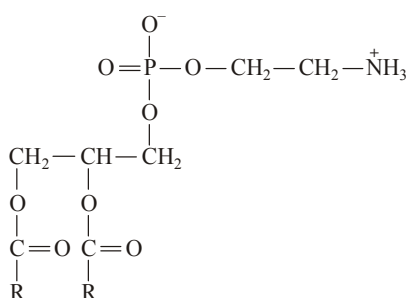
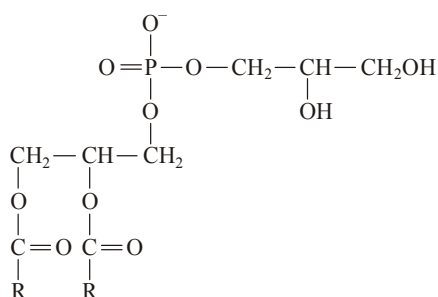
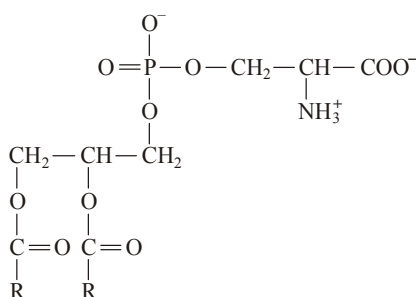
```
            O⁻
            |
      O ═ P — O — CH2 — CH — COO⁻
            |            |
            O            NH3⁺
            |
CH2 — CH — CH2
|      |
O      O
|      |
C═O  C═O
|      |
R      R
```

Fosfatidilserina

Figura 9.3
Glicerofosfolipídeos comuns. Estruturas de quatro glicerofosfolipídeos mais comuns: Fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol e fosfatidilserina.

2. Esfingomielinas. As esfingomielinas diferem dos fosfoglicerídeos por conterem *esfingosina* (aminoálcool) em lugar de glicerol. Como as esfingomielinas também são classifcadas como esfingolipídeos, suas estruturas e propriedades são descritas mais adiante.

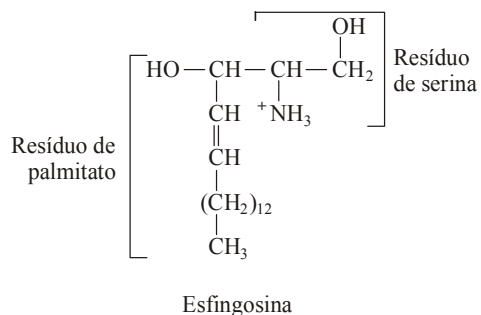
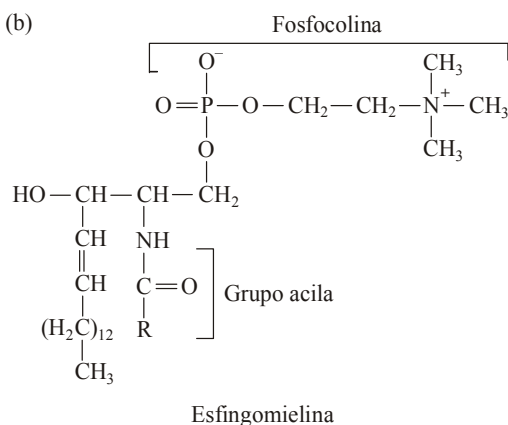



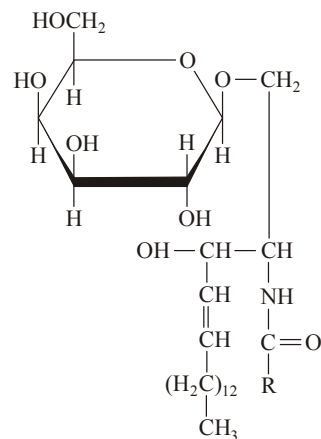
Figura 9.4
Estrutura da esfingosina e da esfigomielina. (a) A estrutura da esfingosina é derivada da serina e palmitato. (b) A ligação de um segundo grupo acila e uma fosfatidilcolina (ou fosfoetanolamina) produz uma esfingomielina.

E. Esfingolipídeos

Os esfingolipídeos são o segundo maior componente lipídico das membranas animais e vegetais. As moléculas de esfingolipídeos contêm um aminoálcool de cadeia longa. Em animais, o aminoálcool é a *esfingosina* e nas plantas é a *fitoesfingosina*. As moléculas mais simples desse grupo são as *ceramidas,* derivadas de ácidos graxos ligados ao grupo amino ($-NH_2$) no C2 da esfingosina. As ceramidas são precursoras das esfingomielinas e glicoesfingolipídeos.

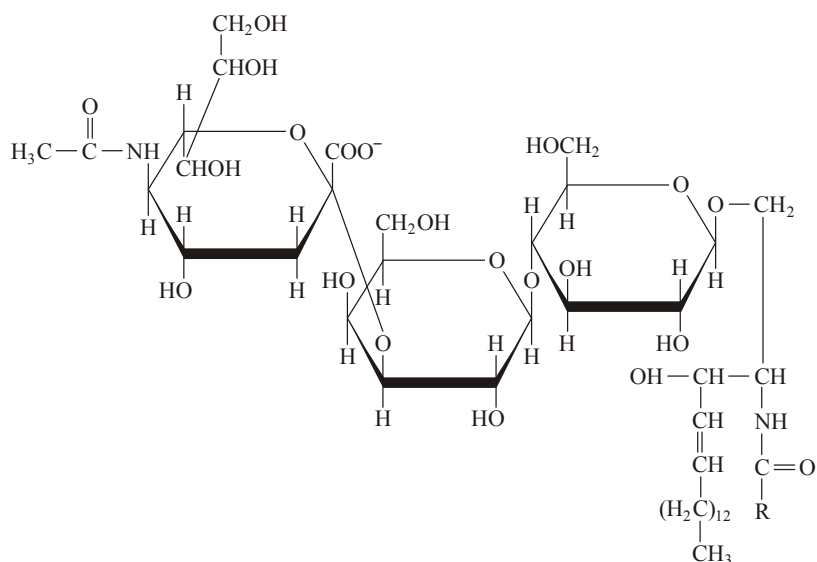
1. Esfingomielina. O grupo álcool primário da ceramida é esterificado ao grupo fosfórico da fosfocolina ou da fosfoetanolamina. A esfingomielina é encontrada na maioria das membranas plasmáticas das células animais. Como o nome sugere, a esfingomielina está presente em grande quantidade na bainha de mielina que reveste e isola os axônios em neurônios. As suas propriedades isolantes facilitam a rápida transmissão dos impulsos nervosos.

2. Glicoesfingolipídeos. As ceramidas são também precursoras dos *glicoesfingolipídeos* (ou *glicolipídeos*). Nesses compostos, os monossacarídeos, dissacarídeos ou oligossacarídeos estão ligados por ligação *O*−glicosídica. Os glicoesfingolipídeos não contêm grupos fosfato e são eletricamente neutros. As classes mais importantes dos gliceroesfingolipídeos são os cerebrosídeos, os sulfatídeos e os gangliosídeos.

- *Cerebrosídeos.* São esfingolipídeos cujas cabeças polares consistem de um resíduo de monossacarídeo. Os *galactocerebrosídeos,* o exemplo mais comum dessa classe, são encontrados predominantemente nas células das membranas do cérebro.

Um cerebrosídeo

- *Sulfatídeos.* São galactocerebrosídeos que contêm um grupo sulfato esterificado na posição 3 do açúcar. Os sulfatídeos estão negativamente carregados em pH fisiológico.

- *Gangliosídeos.* São os glicoesfingolipídeos que possuem oligossacarídeos com um ou mais resíduos de ácido siálico (ácido

N–acetilneuramínico). Os nomes dos gangliosídeos incluem letras e números subscritos. As letras M, D e T indicam que a molécula contém um, dois ou três resíduos de ácido siálico, respectivamente. Os números designam a seqüência de açúcares ligados a ceramida. Os gangliosídeos G_{M1}, G_{M2} e G_{M3} são os mais conhecidos. Os gangliosídeos são componentes das membranas da superfície celular.

Um gangliosídeo

Os glicoesfingolipídeos podem atuar como receptores de certas toxinas protéicas bacterianas, como as que causam cólera, tétano e botulismo. Algumas bactérias também ligam-se aos receptores glicolipídicos, exemplo *E. coli, Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria gonorrhoeae,* agentes causadores de infecções urinárias, pneumonia e gonorréia, respectivamente.

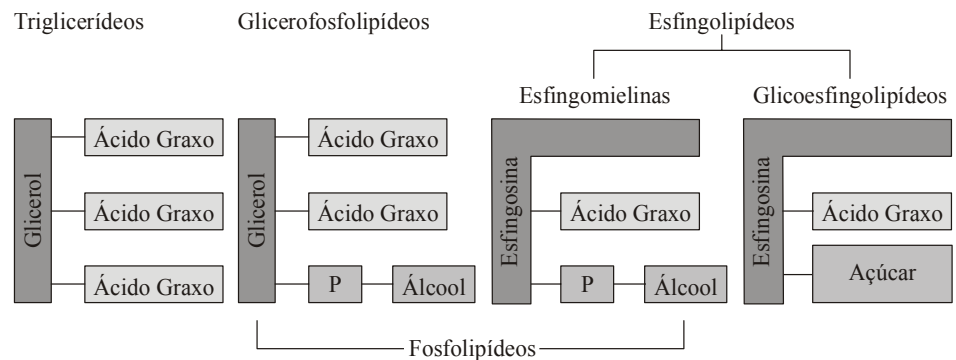



Figura 9.5
Representação das principais classes de lipídeos. Açúcar = mono ou oligossacarídeo, P = grupo fosfato.

F. Doenças do armazenamento de esfingolipídeos (*esfingolipidoses*)

São causadas por defeitos hereditários de enzimas necessárias para a degradação dos esfingolipídeos nos lisossomas e provocam o acúmulo desses compostos nas células. A mais comum é a doença de Tay−Sachs, causada pela deficiência da β−hexoaminidase A, a enzima que degrada o gangliosídeo G_{M2}. Como a célula acumula essa molécula, ocorre uma deterioração neurológica. Os sintomas da doença (cegueira, fraqueza muscular e retardo mental) geralmente aparecem alguns meses após o nascimento. Não existe terapia para as doenças de armazenamento dos esfingolipídeos e, portanto, são fatais.

Quadro 9.1. Doenças do armazenamento de esfingolipídeos

Doença	Sintoma	Esfingolipídeo acumulado	Enzima deficiente
Doença de Tay−Sachs	Cegueira, fraqueza muscular, retardo mental	Gangliosídeo G_{M2}	β−Hexoaminidase A
Doença de Gaucher	Retardo mental, esplenomegalia, hepatomegalia, erosão de ossos longos	Glicocerebrosídeo	β−Glicosídeo
Doença de Krabbe	Desmielinização, retardo metal	Galactocerebrosídeo	β−Galactosidase
Doença de Niemann−Pick	Retardo mental	Esfingomielina	Esfingomielinase

G. Isoprenóides

Os isoprenóides são um vasto grupo de biomoléculas que contém unidades estruturais repetidas de cinco carbonos conhecidas como *unidades de isoprenos*. Os isoprenóides são sintetizados a partir do isopentenil pirofosfato formado do acetil−CoA.

Os isoprenóides consistem de terpenos e esteróides. Os *terpenos* são um enorme grupo de substâncias encontradas em óleos essenciais

das plantas. Os *esteróides* são derivados do anel hidrocarbonado do colesterol.

1. Terpenos. Os terpenos são classificados de acordo com o número de resíduos de isopreno que contém. Os *monoterpenos* são compostos de duas unidades de isopreno (10 átomos de carbono). O geraniol é um monoterpeno encontrado no óleo de gerânio. Terpenos que contêm três isoprenóides (15 carbonos) são denominados sesquiterpenos. Farnesene, um importante constituinte do óleo de citronela (uma substância usada em sabões e perfumes), é um sesquiterpeno. Fitol, um álcool vegetal, é um exemplo de diterpenos, moléculas compostas de quatro unidades de isoprenos. O esqualeno, encontrado em grande quantidade no óleo de fígado de tubarões, azeite de oliva e levedura, é um exemplo de *triterpenos.* (Esqualeno é um intermediário da síntese do esteróides). Os *carotenóides,* o pigmento laranja encontrado em muitas plantas, são *tetraterpenos* (moléculas compostas de oito unidades de isopreno). Os carotenos são membros hidrocarbonados desse grupo. Os *politerpenos* são moléculas de elevado peso molecular composto de centenas ou milhares de unidades de isopreno. A borracha natural é um politerpeno composto de 3.000-6.000 unidades de isopreno.

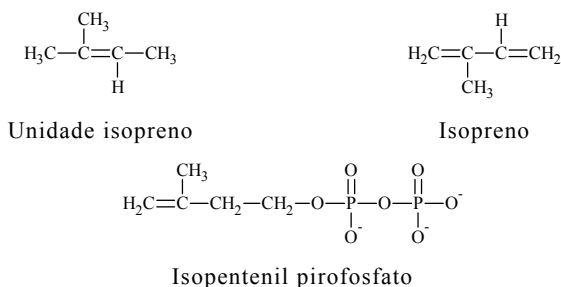
$H_3C{-}C(CH_3){=}C(H){-}CH_3$

Unidade isopreno

$H_2C{=}C(CH_3){-}C(H){=}CH_2$

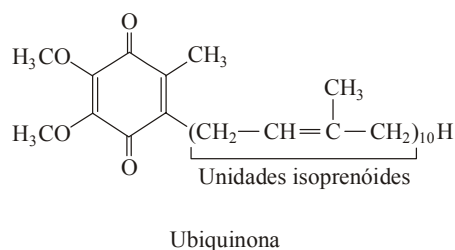
Isopreno

$H_2C{=}C(CH_3){-}CH_2{-}CH_2{-}O{-}P(=O)(O^-){-}O{-}P(=O)(O^-){-}O^-$

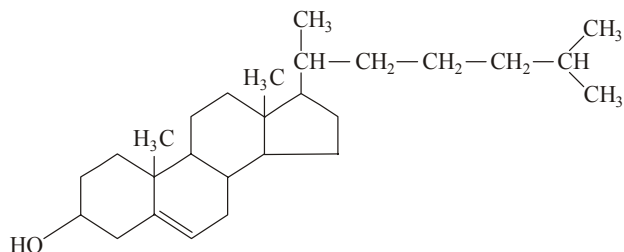
Isopentenil pirofosfato

Várias biomoléculas importantes são formadas por componentes não-terpenos ligados a grupos isoprenóides. Exemplos incluem vitamina E (α-tocoferol), ubiquinona, vitamina K e algumas citocinas.

Ubiquinona: anel quinona com H_3CO, H_3CO, CH_3 e $(CH_2{-}CH{=}C(CH_3){-}CH_2)_{10}H$

Unidades isoprenóides

Ubiquinona

2. Esteróides. São complexos derivados dos triterpenos encontrados em células eucarióticas e em algumas bactérias. Cada esteróide é composto de quatro anéis não-planares fusionados, três com seis carbonos e um com cinco. Distinguem-se os esteróides pela localização de ligações duplas carbono-carbono e vários substituintes (exemplo, grupos hidroxil, carbonil e alquila).

O *colesterol*, uma importante molécula dos tecidos animais, é um exemplo de um esteróide. Além de ser um componente essencial das membranas biológicas, o colesterol é um precursor na biossíntese de todos os hormônios esteróides, vitamina D e sais biliares. O

colesterol é geralmente armazenado nas células como éster de ácido graxo. A reação de esterificação é catalisada pela enzima *acil-CoA:colesterol aciltransferase* (ACAT), localizada na face citoplasmática do retículo endoplasmático.

Colesterol

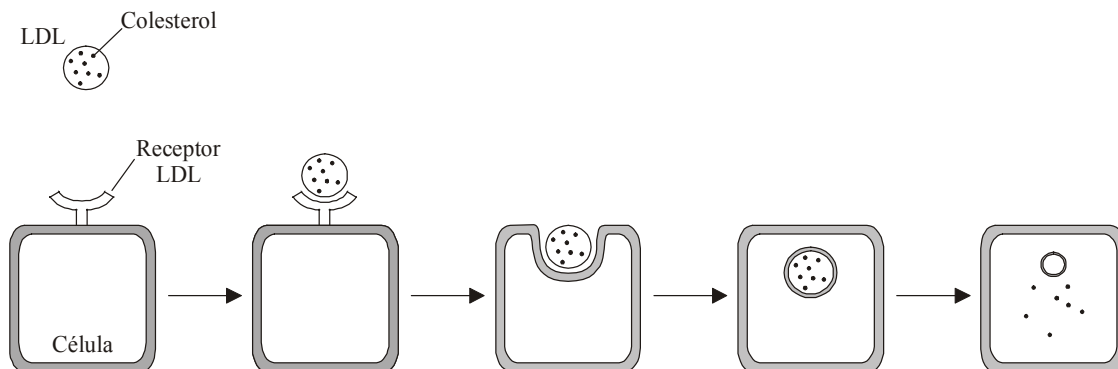
Os glicosídeos cardíacos, moléculas que aumentam a intensidade da contração do músculo cardíaco, estão entre os mais interessantes derivados dos esteróides. Os glicosídeos são acetais contendo carboidrato. Apesar de vários glicosídeos cardíacos serem extremamente tóxicos (exemplo, *ouabaína,* obtida de sementes da planta *Strophantus gratus*), outros apresentam propriedades medicinais. Por exemplo, *digitalis,* um extrato de folhas secas da *Digitalis purpúrea* (planta ornamental dedaleira), é um estimulador da contração do músculo cardíaco. A *digitoxina*, o principal glicosídeo "cardiotônico" no digitalis, é usado no tratamento da insuficiência cardíaca por obstrução dos vasos. Em concentrações acima das terapêuticas, a digitoxina é extremamente tóxica. Tanto a ouabaína como a digitoxina inibem a $(Na^+–K^+)$–ATPase.

9.2 Lipoproteínas

Os triacilgliceróis, o colesterol e os ésteres de colesteril são insolúveis em água e não podem ser transportados na circulação como moléculas livres. Em lugar disso, essas moléculas se agregam com os fosfolipídeos e proteínas anfipáticas para formar partículas esféricas macromoleculares conhecidas como *lipoproteínas.* As lipoproteínas têm núcleo hidrofóbico contendo triacilgliceróis e ésteres de colesteril, e camada superficial externa hidrofílica que consiste de uma camada de moléculas anfipáticas: colesterol, fosfolipídeos e proteínas (apoproteínas ou apolipoproteínas). As lipoproteínas também contêm várias moléculas antioxidantes solúveis em lipídeos (exemplo, α-tocoferol e vários carotenóides). (Os antioxidantes destroem os radicais livres, como o radical superóxido e radical hidroxila). As lipoproteínas são classificadas de acordo com sua densidade:

1. Quilomícrons. Transportam os lipídeos da dieta por meio da linfa e sangue do intestino para o tecido muscular (para obtenção de energia por oxidação) e adiposo (para armazenamento). Os quilomícrons estão presentes no sangue somente após a refeição. Os quilomícrons remanescentes ricos em colesterol – que já perderam a maioria de seu triacilgliceróis pela ação da lipoproteína–lipase capilar – são captados pelo fígado por endocitose.

2. Lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). São sintetizadas no fígado. Transportam triacilgliceróis e colesterol endógenos para os tecidos extrahepáticos. No transporte das VLDL através do organismo, os triacilgliceróis são hidrolizados progressivamente pela lipoproteína–lipase até ácidos graxos livres e glicerol. Alguns ácidos graxos livres retornam a circulação, ligados à albumina, porém a maior parte é transportada para o interior das células. Eventualmente, as VLDL remanescentes triacilglicerol–depletados são captadas pelo fígado ou convertidas em lipoproteínas de densidade baixa (LDL). A VLDL é precursora da IDL (lipoproteína de densidade intermediária), que por sua vez é precursora da LDL.

3. Lipoproteínas de densidade baixa (LDL). As partículas de LDL são formadas a partir das VLDL. As LDL enriquecidas de colesterol e ésteres de colesteril transportam esses lipídeos para os tecidos periféricos. A remoção de LDL da circulação é mediada por receptores de LDL (sítios específicos de ligação) encontrados tanto no fígado como em tecidos extrahepáticos. Um complexo formado entre a LDL e o receptor celular entra na célula por endocitose (engolfamento). As lípases dos lisossomos e proteases degradam as LDL. O colesterol liberado é incorporado nas membranas celulares ou armazenado como ésteres de colesteril. A deficiência de receptores celulares para as LDL desenvolve *hipercolesterolemia familiar,* na qual o colesterol acumula no sangue e é depositado na pele e artérias.

4. Lipoproteínas de densidade alta (HDL). As HDL removem o colesterol do plasma e dos tecidos extrahepáticos, transportando-o para o fígado. Na superfície hepática, a HDL se liga ao receptor SR-B1 e transfere o colesterol e os ésteres de colesteril para o interior do hepatócito. A partícula de HDL com menor conteúdo de lipídeos retorna ao plasma. No fígado o colesterol pode ser convertido em sais biliares, que são excretados na vesícula. O risco de aterosclerose (depósito de colesterol nas artérias) diminui com a elevação dos níveis de HDL e aumenta com a elevação da concentração das LDL.

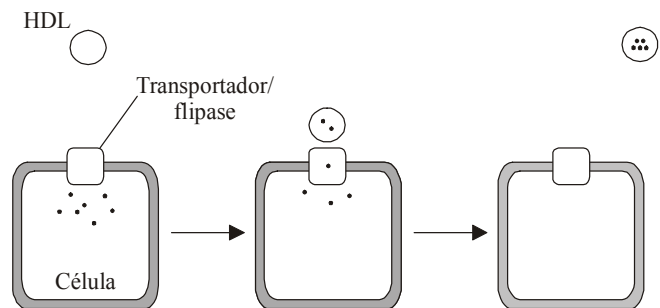



Tabela 9.2 – Classificação, propriedades e composição das lipoproteínas humanas.

Parâmetro	Quilomícrons	VLDL	LDL	HDL
Densidade (g/mL)	<0,95	0,95–1,006	1,019–1,063	1,063–1,21
Diâmetro (nm)	>70	30–80	18–28	5–12
Mobilidade eletroforética	Origem	Pré–β	β	α
Composição (% do peso)				
Colesterol livre	2	5–8	13	6
Colesterol esterificado	5	11–14	39	13
Fosfolipídeos	7	20–23	17	28
Triglicerídeos	84	44–60	11	3
Proteínas	2	4–11	20	50
Local de síntese	Intestino	Intestino, fígado	Intravascular	Intestino, fígado

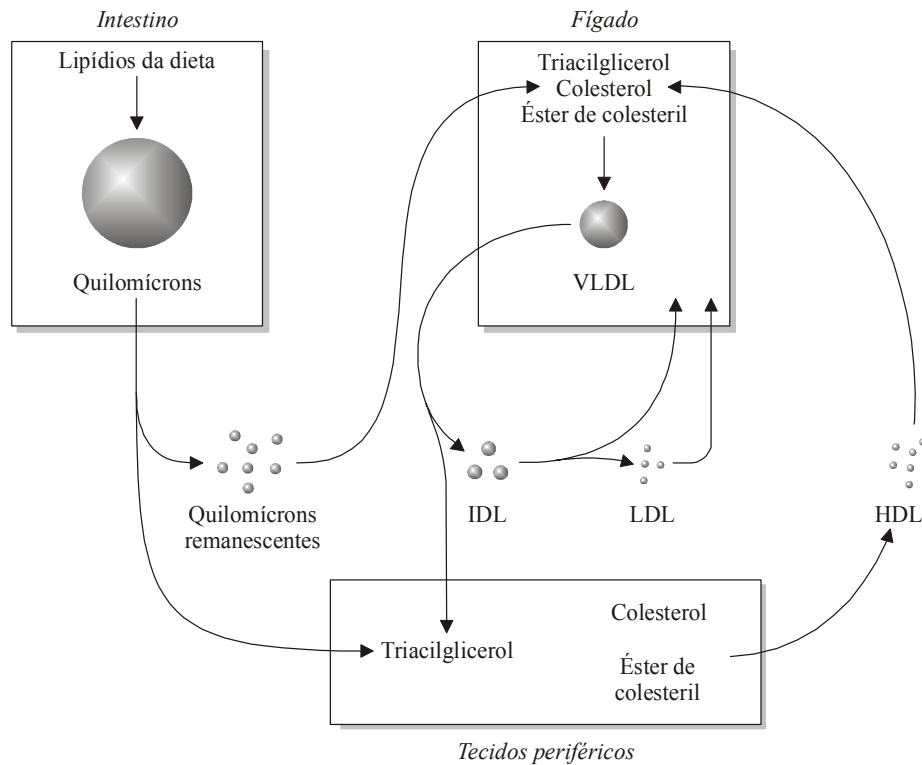



Figura 9.6
Visão geral do metabolismo das lipoproteínas. Os quilomícrons formados nas células intestinais transportam os triacilgliceróis para os tecidos periféricos, incluindo o músculo e o tecido adiposo. Os quilomícrons remanescentes entregam os ésteres de colesteril para o fígado. As VLDL são formadas no fígado e transportam os lipídeos endógenos para os tecidos periféricos. Quando as VLDL são degradas (via IDL) o colesterol é esterificado com ácidos graxos provenientes do HDL para tornar-se LDL, que transporta o colesterol para os tecidos extra-hepáticos. A HDL envia o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado.

A. Lipoproteínas e aterosclerose

Aterosclerose é caracterizada por depósitos lipídicos irregularmente distribuídos na camada íntima de artérias de grosso e médio calibres, provocando o estreitamento das luzes arteriais e evoluindo, por fim, para fibrose e calcificação. A limitação do fluxo sangüíneo é responsável pela maioria dos sintomas clínicos.

Os fatores de risco para a doença arterial coronária são capazes de lesar o endotélio vascular causando disfunção endotelial. A partir do dano vascular, ocorre a expressão de *moléculas de adesão das células vasculares* (VCAM−1) e *proteína quimiotática de monócitos* (MCP−1) que atraem a entrada de monócitos em direção ao espaço intimal. Os monócitos – que se transformam em macrófagos sob a influência do *fator estimulador de colônias de macrófagos/monócitos* (M−CSF) no espaço intimal – englobarão lipoproteínas modificadas (predominantemente LDL oxidadas), originando as células espumosas.

Quadro 9.1 Fatores de risco para a doença arterial coronária

São parâmetros que parecem guardar relação de causa e efeito, com a doença arterial coronária. Fatores de risco são atributos associados a um aumento substancial da suscetibilidade individual para a doença coronária, e em especial, para o seu aparecimento precoce. Os principais são:

Tabagismo

Hipertensão arterial sistêmica (≥140/90 mmHg)

Hipercolesterolemia >200 mg/dL (LDL-C >160 mg/dL)

HDL-C baixo (<40 mg/dL)

Diabetes melito

Hipertrigliceridemia (>200 mg/dL)

Obesidade (IMC >25 kg/m^2)

Sedentarismo

Idade (≥45 anos homens e ≥55 anos mulheres)

História familiar precoce de aterosclerose (parentes de primeiro grau <55 anos homens e <65 anos mulheres)

Fatores de risco emergentes: lipoproteína (a), homocisteína, fatores hemostáticos (antígeno do PA–1 e t–PA), fatores proinflamatórios (proteína C reativa), glicemia de jejum alterada e aterosclerose subclínica.

Danos posteriores ocorrem quando as células endoteliais e da musculatura lisa iniciam a secreção de alguns peptídios pequenos, como o *fator de crescimento derivado de plaquetas* (PDGF), *interleucina–1* (IL–1) e *fator de necrose tumoral* (TNF), que estimulam, perpetuam e ampliam o processo, levando à formação da placa aterosclerótica. Esta é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico. As placas podem ser divididas em estáveis ou instáveis.

9.3 Membranas biológicas

Muitas das propriedades dos organismos vivos (exemplo, movimento, crescimento, reprodução e metabolismo) dependem, direta ou indiretamente, das membranas celulares. As *membranas biológicas* envolvem todas as células como também separam as organelas no seu interior. No entanto, as membranas biológicas não são meramente barreiras passivas; elas executam uma grande variedade de funções complexas. Algumas proteínas presentes nas membranas atuam como bombas seletivas que controlam o transporte de íons e pequenas moléculas para dentro e para fora da célula e também geram gradientes de prótons essenciais para a produção de ATP pela fosforilação oxidativa. Por meio do controle dos sistemas de transporte seletivo, as concentrações de substâncias em compartimentos celulares são moduladas, excercendo, assim, influência sobre as vias metabólicas. Receptores protéicos específicos nas membranas reconhecem sinais extracelulares (hormônios, reguladores de crescimento e de metabolismo) e comunica-os para o interior das células.

As membranas biológicas típicas possuem cerca de 25-50% de lipídeos e 50-75% de proteínas. No conceito atualmente aceito, denominado *modelo do mosaico fluido* proposto por Singer e Nicolson em 1972, a membrana é uma bicamada lipídica constituída por uma mistura complexa de fosfolipídeos (glicerofosfolipídeos), esteróis e esfingolipídeos cujas regiões não-polares são orientadas para o centro da bicamada, e os grupos polares para o exterior. As proteínas estão embebidas na bicamada lipídica e determinam as funções biológicas da membrana.

Como cada espécie de célula e organela possui suas próprias funções, os componentes lipídicos e protéicos das membranas também são únicos para cada uma delas. Assim, as membranas são constituídas por diferentes tipos de lipídeos e de proteínas em combinações que variam consideravelmente. Por exemplo, a bainha de mielina que envolve certos nervos, contém relativamente pouca proteína. Em contraste, a membrana mitocondrial interna é rica em proteínas, refletindo seu elevado grau de atividade metabólica. A membrana plasmática dos eritrócitos é também excepcionalmente rica em proteínas.

Apesar da diversidade da composição e de funções das membranas, elas compartilham certos atributos fundamentais:

1. As membranas são estruturas em forma de lâmina com duas moléculas de espessura que circundam diferentes compartimentos. A espessura da maioria das membranas é 6nm a 10nm.

2. As membranas consistem principalmente de lipídeos e proteínas, mas também contêm carboidratos tais como, glicoproteínas e glicolipídeos.

3. Os lipídeos das membranas são moléculas relativamente pequenas com porções *hidrofílicas* e *hidrofóbicas*. Quando misturados em água esses lipídeos espontaneamente formam três tipos de agregados: *micelas, bicamadas* e *lipossomos*.

4. Proteínas específicas mediam distintas funções das membranas. Atuam como bombas, canais, receptores, enzimas e transdutores de energia. As proteínas das membranas estão embebidas nas bicamadas lipídicas, que criam um meio apropriado para a sua ação.

5. As membranas são *associações não–covalentes*. As moléculas de proteínas e as de lipídeos estão unidas por interações não-covalentes.

6. A maioria das membranas são *eletricamente polarizadas,* cujo interior é negativa [tipicamente −60 milivolts (mV)]. O potencial de membrana exerce papel fundamental no transporte, na conversão de energia e na excitabilidade.

A. Lipídeos da membrana

Os principais lipídeos de membranas são: gliceroesfingolipídeos, esfingolipídeos, glicoesfingolipídeos e colesterol. As várias membranas celulares de diferentes tcidos têm distintas composições lipídicas. Os *gliceroesfingolipídeos* e *esfingolipídeos* são moléculas anfipáticas (caudas hidrofóbicas e cabeças hidrofílicas) que constituem os lipídeos mais comuns das membranas celulares. Os ácidos graxos presentes nos gliceroesfingolipídeos e esfingolipídeos das biomembranas são alifáticos de cadeia longa e, em geral, com C16 e C18. Cerca de 50% dos ácidos graxos presentes nas membranas são insaturados, com uma ou mais duplas ligações carbono-carbono na configuração *cis*.

Os *glicoesfingolipídeos* têm um açúcar ligado e não contêm fosfato e são não-iônicos. As classes mais importantes são: os cerebrosídeos, os sulfatídeos e os gangliosídeos.

O colesterol não forma bicamadas por si mesmo mas compõe cerca de 30% do conteúdo lipídico das membranas biológicas. O colesterol modifica a fluidez da membrana e participa do controle da microestrutura das membranas plasmáticas.

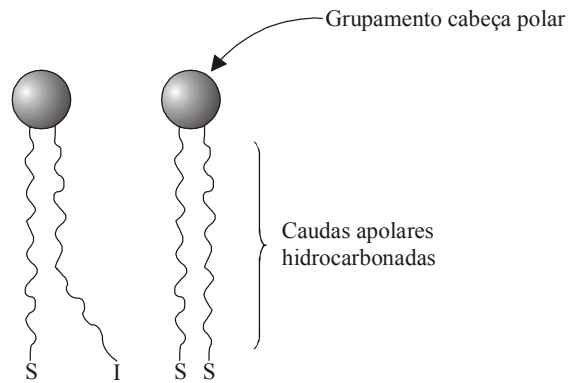



Figura 9.7
Representação esquemática de fosfolipídeos ou outros lipídeos de membrana. O grupamento cabeça polar é hidrofílico, e as caudas hidrocarbonadas são hidrofóbicas. Os ácidos graxos nas caudas são saturados (S) ou insaturados (I).

Quando em concentrações adequadas, as moléculas anfipáticas são suspensas em água e espontaneamente são agregadas em estruturas esféricas chamadas *micelas*. As caudas hidrofóbicas hidrocarbonadas ficam voltadas para o interior excluindo a água, enquanto os grupos das cabeças polares (grupos hidrofílicos) ficam no lado de fora da esfera para interagir com a água permitindo a solvatação.

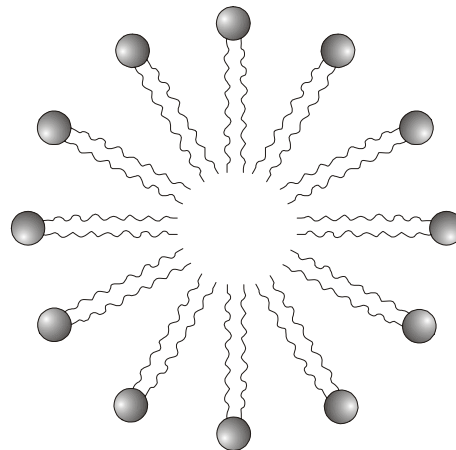



Figura 9.8
Micela constituída por agregado de lipídeos de cauda dupla. Os grupamentos cabeça polares estão em contato com a água, enquanto as caudas hidrofóbicas hidrocarbonadas estão protegidas da água.

Quando em concentrações apropriadas, os lipídeos anfipáticos organizam-se espontaneamente na água para formar *bicamadas lipídicas,* nas quais duas camadas de lipídeos formam uma lâmina

bimolecular. As porções hidrofóbicas em cada lâmina, excluídas de água, interagem entre si. Essa propriedade dos fosfolipídeos (e de outras moléculas lipídicas anfipáticas) estabelece a estrutura básica de todas as membranas biológicas.

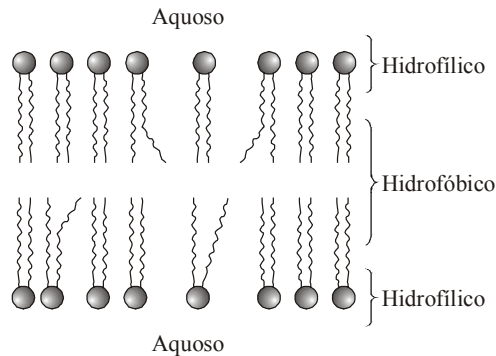



Figura 9.9
Representação esquemática de bicamadas lipídicas. As estruturas anfifílicas contêm cabeças polares ligadas a caudas sinuosas hidrofóbicas. As caudas de ácidos graxos insaturados estão dobradas, resultando em maior espaçamento entre os grupamentos cabeça polares e, portanto, maior espaço para movimento.

Os lipídeos das membranas são responsáveis por várias outras características importantes das membranas biológicas:

1. Fluidez da membrana. Por não estarem ligadas covalentemente, existe liberdade para as moléculas individuais dos lipídeos e das proteínas se movimentarem lateralmente no plano da membrana. A rápida *difusão lateral* de moléculas de lipídeos nas bicamadas é, aparentemente, responsável pelo funcionamento apropriado de muitas moléculas protéicas. (O movimento de transverso não catalisado de um lado para outro – *flip–flop* – dos glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos nas bicamadas é extremamente raro). A fluidez da membrana é principalmente determinada pela percentagem de ácidos graxos insaturados presentes nas moléculas de fosfolipídeos. Altas concentrações de cadeias insaturadas resultam em membranas mais fluidas. O colesterol modula a estabilidade da membrana sem comprometer grandemente a fluidez por conter elementos estruturais rígidos (sistema de anéis esteróides) e flexíveis (caudas de hidrocarbonetos) que interferem na movimentação das cadeias laterais de ácidos graxos.

2. Permeabilidade seletiva. Devido a sua natureza hidrofóbica, as cadeias hidrocarbonadas nas bicamadas lipídicas organizam uma barreira virtualmente impenetrável para o transporte de substâncias iônicas e polares. Proteínas membranas específicas regulam o movimento dessas substâncias para dentro e para fora das células. Cada membrana exibe sua própria capacidade de transporte ou seletividade baseado em seus componentes protéicos.

3. Capacidade de auto-selar. Quando as bicamadas lipídicas são rompidas, elas imediata e espontaneamente são reconstituídas porque uma quebra na camada lipídica expõem as cadeias de hidrocarbonetos hidrofóbicas à água. Como a brecha nas membranas celulares podem ser letais, a propriedade de reconstituição é crítica.

4. Assimetria. As membranas biológicas são assimétricas; ou seja, os componentes lipídicos das duas lâminas da bicamada são diferentes. Por exemplo, a membrana dos eritrócitos humanos possuem substancialmente mais fosfatidilcolina e esfingomielina na superfície externa. A maior parte da fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina da membrana está na superfície interna. A assimetria da membrana é fundamental pois cada lado da membrana está exposta a diferentes compartimentos (intracelular e extracelular, respectivamente). A assimetria tem lugar durante a síntese de membrana, já que a biossíntese dos fosfolipídeos ocorre somente em um lado da membrana. Os componentes protéicos das membranas também exibem considerável assimetria com distintos domínios funcionais diferentes dentro da membrana e as faces citoplasmáticas e extracelulares da membrana.

B. Proteínas de membrana

A maioria das funções associadas com as membranas biológicas necessita de moléculas de proteínas. As proteínas de membrana são classificadas de acordo com seus modos de associação com a bicamada lipídica em proteínas integrais, proteínas periféricas e proteínas ligadas a lipídeos. Grande parte dessas moléculas são componentes estruturais, enzimas, receptores de hormônios ou proteínas transportadoras.

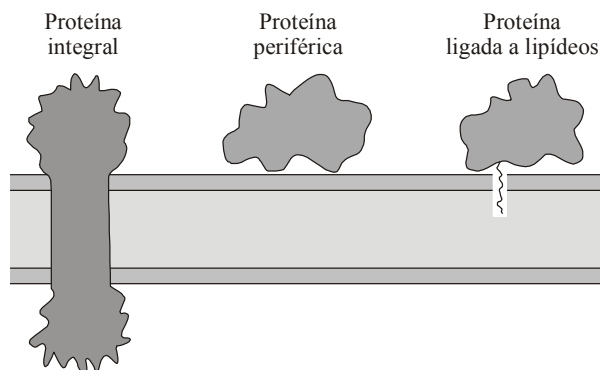



Figura 9.10
Proteínas de membrana. Representação esquemática de proteína integral firmemente associada à membrana por interações hidrofóbicas, proteína periférica ligada por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio e proteína ligada a lipídeos por meio de cauda hidrofóbina incorporada à bicamada.

1. Proteínas integrais (intrínsicas). São proteínas firmemente associadas às membranas por meio de ligações hidrofóbicas. Essas moléculas só podem ser separadas pelo rompimento da membrana por agentes que interferem nas interações hidrofóbicas, como solventes orgânicos, desnaturantes ou detergentes.

As duas mais importantes *proteínas integrais* de membranas dos eritrócitos são a glicoforina e a proteína de canais de ânions. A *glicoforina* é uma glicoproteína com 131 aminoácidos. Cerca de 60% de seu peso são carboidratos. Certos grupos oligossacarídeos da glicoforina constituem os antígenos dos grupos sangüíneos ABO e MN. Entretanto, apesar de todas as pesquisas, as funções da glicoforina ainda são desconhecidas. A *proteína de canais de ânions* é

composta de duas subunidades idênticas, cada uma consistindo de 929 aminoácidos. Essa proteína exerce um importante papel no transporte de CO_2 no sangue. O íon HCO_3^- formado a partir do CO_2 pela ação da anidrase carbônica, difunde através da membrana do eritrócito por meio dos canais de ânions em troca do íon Cl^-. A troca de Cl^- por HCO_3^-, chamada *desvio do cloreto,* preserva o potencial elétrico da membrana dos eritrócitos.

2. Proteínas periféricas (extrínsicas). São proteínas ligadas às membranas por meio de interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio. Algumas proteínas periféricas interagem diretamente com a camada bilipídica. Normalmente, as proteínas periféricas podem ser liberadas das membranas por procedimentos relativamente simples, tais como, uso de soluções salinas concentradas ou mudanças de pH que alteram as interações não-covalentes entre as cadeias laterais de aminoácidos.

As proteínas periféricas de membranas dos eritrócitos, composta principalmente de espectrina, anquirina e banda 4.1, estão envolvidas na preservação da forma de disco bicôncavo do eritrócito normal. Essa forma permite a rápida difusão de O_2 para as moléculas de hemoglobina, posicionando-as a uma distância menor do que 1 μm da superfície celular. A *espectrina,* uma proteína filamentosa longa, é um tetrâmero, composto de dois dímeros αβ, que ligam a anquirina e a banda 4.1. A *anquirina* é um peptídeo globular de grande tamanho que liga a espectrina à proteína de canal iônico. Essa é uma conexão entre o citoesqueleto dos eritrócitos e sua membrana plasmática. A *banda 4.1* liga-se tanto a espectrina como a *filamentos actina* (um componente citoesquelético encontrado em muitos tipos de células). Como a banda 4.1 também se liga a glicoforina, essa também está associada ao citoesqueleto e a membrana.

3. Proteínas ligadas a lipídeos. São proteínas de membranas que contêm lipídeos ligados covalentemente. Os lipídeos ligados são responsáveis por uma âncora hidrofóbica, a qual se insere no interior da bicamada lipídica e conserva a proteína na superfície da membrana. A ligação das proteínas à lipídeos ocorrem de três modos: (a) *miristoilação*: o ácido mirístico está unido a proteína de membrana por ligação amida com o grupo α-amino da glicina amino−terminal; (b) *palmitolilação*: o ácido palmítico está unido por ligação tioéster a um resíduo de cisteína e (c) *prenilação*: os lipídeos estão ligados às proteínas por unidades de isopreno.

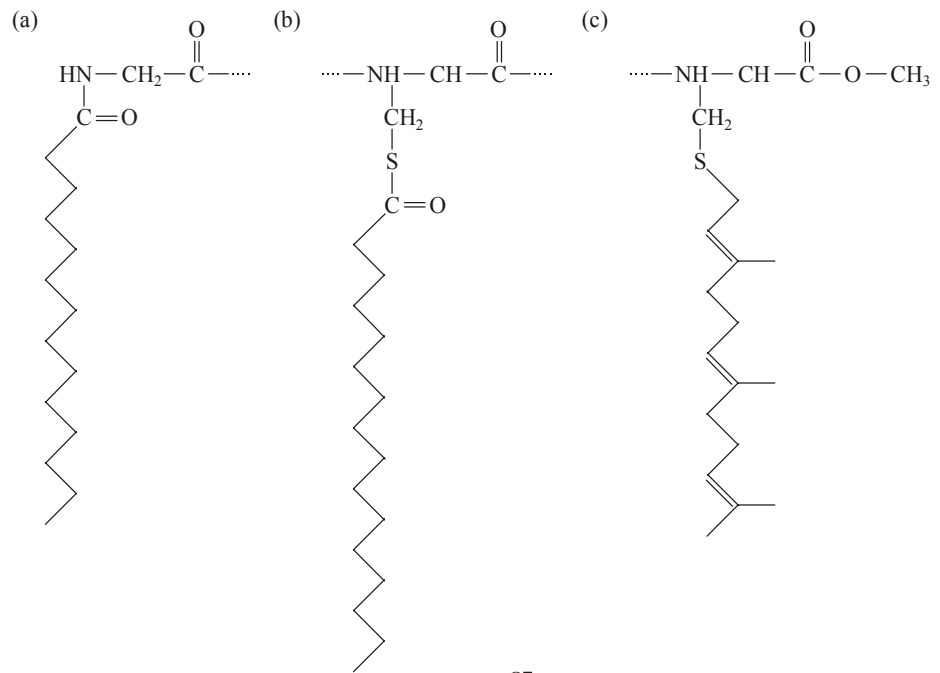



Figura 9.11
Ancoramento de proteínas à membrana. (a) Miristoilação. (b) Palmitoilação. (c) Prenilação. O lipídeo âncora é um grupo farnesil com 15 carbonos.

Muitos eucariotos, particularmente os protozoários parasitas, contêm proteínas ligadas pelo C-terminal a um grupo lipídeo−carboidratos, conhecido como *glicosilfosfatidilinositol* (GPI). A estrutura do grupo GPI consiste de um fosfatidilinositol, um tetrassacarídeo e uma fosfoetanolamina.

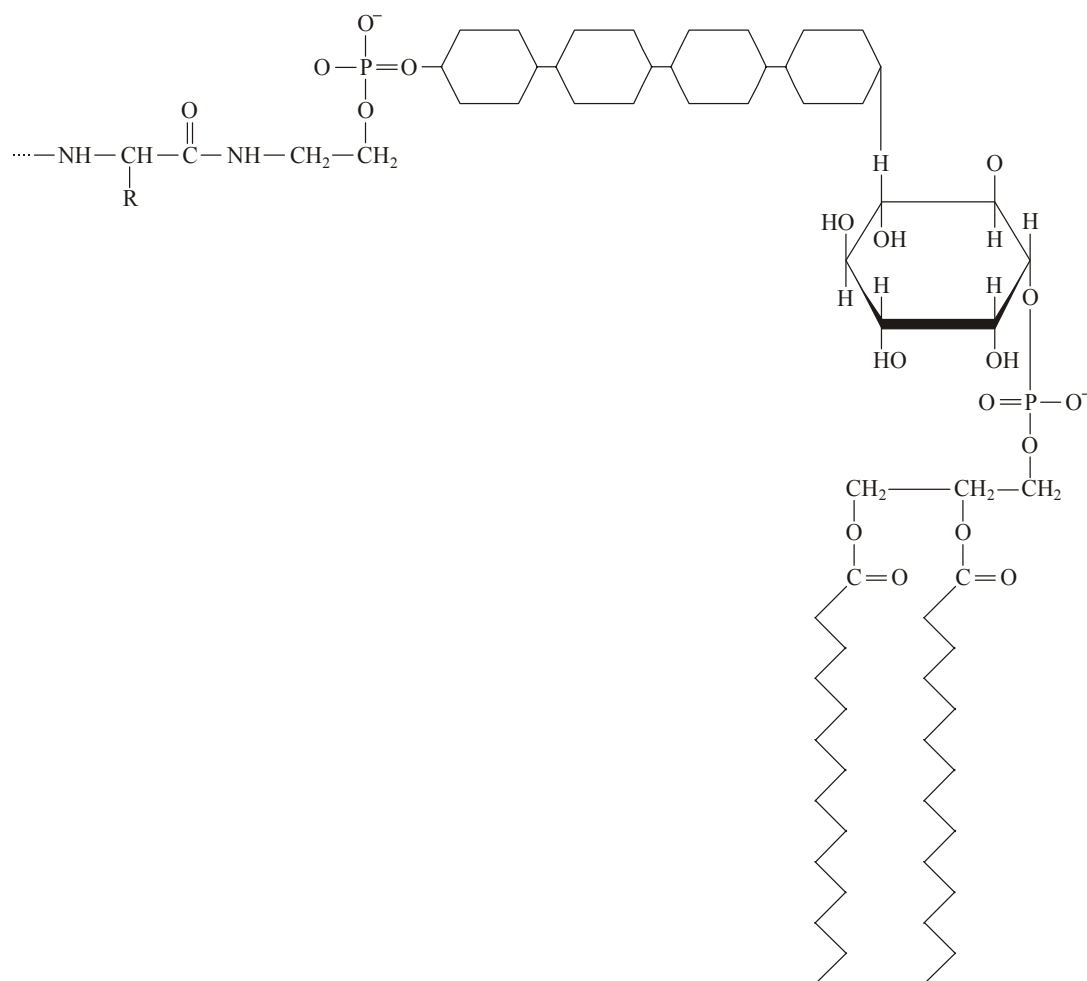



Figura 9.12
Proteínas ligadas a glicosilfosfatidilinositol. Os hexágonos representam diferentes monossacarídeos que variam com a identidade da proteína. Os resíduos de ácidos graxos do grupo fosfatidilinositol também variam consideravelmente.

C. Glicoproteínas de membrana

Como os lipídeos de membrana, as proteínas de membrana estão distribuídas assimetricamente entre as bicamadas. Por exemplo, algumas proteínas ligadas à membrana voltadas para o interior (as proteínas ligadas ao glicosilfosfatidilinositol são exceções). A face exterior da membrana nas células de vertebrados é rica em *glicoesfingolipídeos* (cerebrosídeos e gangliosídeos) e *glicoproteínas.* As cadeias de oligossacarídeos (polímeros de resíduos de monossacarídeos) presentes nas glicoproteínas e que estão covalentemente ancoradas aos lipídeos e as proteínas de membrana envolvem as células como uma cobertura em plumagem.

Várias cadeias de carboidratos estão ancoradas às proteínas como *oligossacarídeos N-ligados* ou *O-ligados.* Em muitas proteínas

solúveis, particularmente as extracelulares, os oligossacarídeos ajudam a estabilizar a proteína sob condições extracelulares hostis.

Os resíduos de monossacarídeo podem ligar-se uns aos outros de diferentes modos e em seqüências potencialmente ilimitadas. Essa diversidade, presente em glicolipídeos e glicoproteínas, é uma forma de informação biológica. Por exemplo, o sistema ABO de grupos sanguíneos é baseado na diferença na composição de carboidratos dos glicolipídeos e das glicoproteínas nos eritrócitos. Muitas outras células parecem reconhecer uma a outra baseado nos carboidratos existentes em suas superfícies.

(a) CH_2OH O H H HO OH H H H NH C=O CH_3 NH—C(=O)—CH_2—CH(NH)(C=O) Asn

(b) CH_2OH O HO H H OH H H NH C=O CH_3 O—CH_2—CH(NH)(C=O) Ser

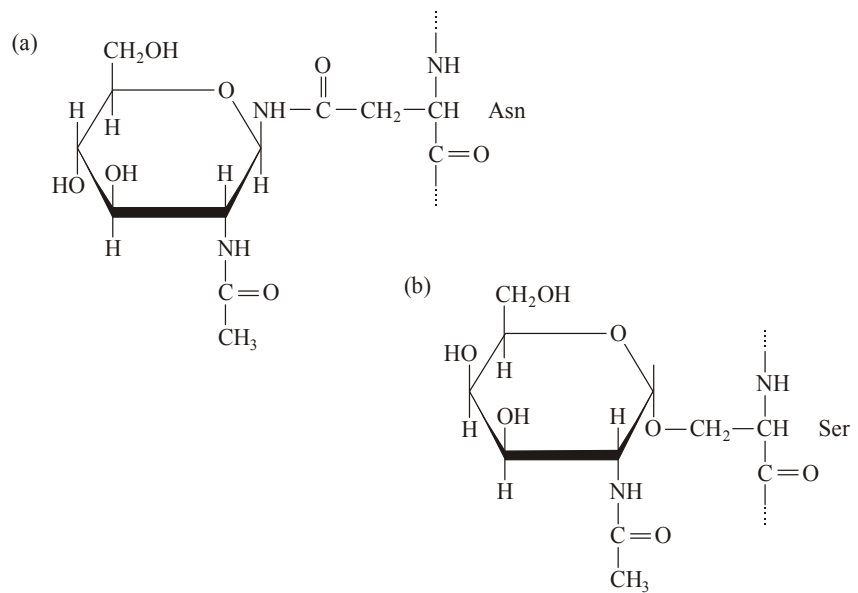



Figura 9.13
Ligação oligossacarídica em glicoproteínas. (a) Nos oligossacarídeos *N*–ligados, o resíduo *N*–acetilglicosamina está ligado por ligação glicosídica à proteína via o N da amida de resíduos específicos de Asn. Os oligossacarídeos tipicamente contêm vários resíduos monossacarídicos adicionais ligados em seqüência a um dos grupos OH da glicosamina. (b) Nos oligossacarídeos O–ligados, a *N*–acetilgalactosamina está covalentemente ligada a átomos de O de cadeias laterais de resíduos específicos de Ser ou Thr.

9.4 Transporte através de membranas

As membranas estão envolvidas em um grande número de funções nas células vivas. Entre as mais importantes estão o (a) transporte de moléculas e íons para o interior e exterior das células e de organelas e (b) ligação de hormônios e outras biomoléculas.

O fluxo de íons e moléculas é altamente regulado para atingir as necessidades metabólicas de cada célula. Por exemplo, a membrana plasmática regula a entrada de moléculas nutrientes e a saída de produtos de excreção, além das concentrações intracelulares de íons. Como as bicamadas lipídicas são geralmente impermeáveis a íons e a moléculas polares, o trânsito é mediado por proteínas integrais que reconhecem e transportam esses compostos: canais de membranas, transportadores passivos (movem substratos a favor do seu gradiente de concentração) e transportadores ativos (movem o substrato contra seu gradiente de concentração). Vários exemplos dessas estruturas,

chamadas transportadores, carreadores, transladadores ou permeases, serão descritas.

Os mecanismos biológicos de transporte são classificados de acordo com suas propriedades cinéticas e com a necessidade ou não de energia. Os diferentes sistemas de transporte são realizados por proteínas integrais de membrana (porinas, canais iônicos, transportadores passivos e transportadores ativos), também como por exocitose e endocitose.

A. Sistemas de transporte

O transporte de substratos através das membranas é executada por proteínas integrais de membrana que se ligam a um substrato de um lado da membrana, conduzem-no através da bicamada e liberam-no no outro lado. Os transportadores diferem quanto ao número de solutos (substratos) transportados e na direção em cada um é transportado. O transporte pode ser classificado como:

- *Uniporte* (transporte único) envolve o movimento de uma única molécula de soluto de cada vez. A família de transportadores de glicose constituída de cinco membros, denominados GLUT-1 a GLUT-5 exemplifica o uniporte.
- *Simporte* (co–transporte) transporta simultaneamente duas moléculas diferentes de soluto na mesma direção. A glicose, aminoácidos, muitos íons e outros nutrientes presentes no filtrado dos túbulos proximais dos rins são quase completamente reabsorvidos por processos de simporte.
- *Antiporte* (contratransporte) transporta simultaneamente duas moléculas diferentes de soluto em direções opostas.

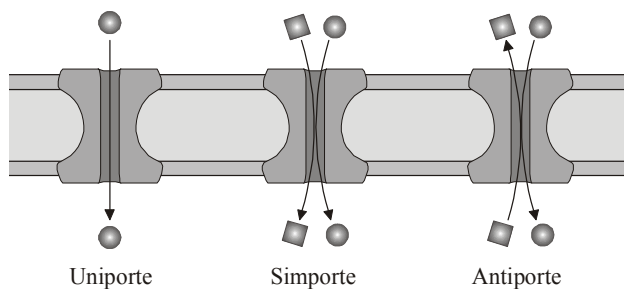



Figura 9.14 – Sistemas de transporte uniporte, simporte e antiporte.

A classificação não descreve se os processos necessitam energia (transporte ativo) ou independentes de energia (transporte passivo).

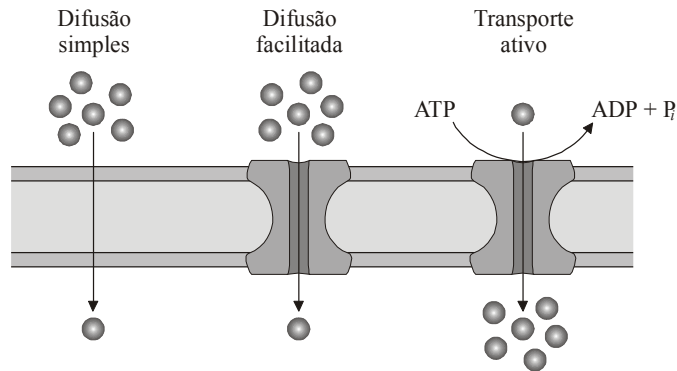



Figura 9.15
Transporte de soluto através de membranas.

B. Porinas

As porinas são as mais simples transportadoras de membrana. Estão localizadas nas membranas externas das bactérias, mitocôndrias e cloroplastos. São proteínas intrínsicas de membrana que permitem a livre difusão de moléculas de até 1000 D a favor do seu gradiente de concentração. Todas as porinas conhecidas são trímeros protéicos nos quais cada subunidade forma um domínio de 16 ou 18 fitas de barril β.

As membranas externas de algumas bactérias são ricas em porinas que permitem a passagem de íons ou pequenas moléculas de um lado da membrana para o outro. As porinas são seletivas a solutos; atuam como peneira permanentemente aberta.

As *aquaporinas* são proteínas integrais que formam canais para a passagem de moléculas de água através das membranas plasmáticas. Atuam na reabsorção, retenção, secreção e captação de água em vários tecidos. Existem no mínimo dez aquaporinas nos mamíferos com seis segmentos helicoidais que estão envolvidas em diferentes funções.

C. Canais iônicos

As membranas plasmáticas das células animais contêm muitos canais protéicos altamente específicos para determinados íons. Alguns desses canais estão sempre abertos enquanto outros, abrem e fecham em resposta a sinais específicos. As membranas de células nervosas possuem canais de potássio que permitem a passagem rápida do íon. Os canais permitem aos íons K^+ passar até 10.000 vezes mais facilmente que os íons Na^+. Os canais de K^+ são constituídos de quatro subunidades idênticas que atravessam a membrana e formam um cone que circunda o canal iônico. As entradas internas e externas dos canais possuem aminoácidos carregados negativamente que atraem cátions e repelem ânions. Os cátions hidratados promovem uma contração eletricamente neutra do canal chamada seletividade iônica do filtro. Os íons potássio perdem rapidamente parte de sua água de hidratação e atravessam o filtro seletivo. Os íons sódio aparentemente retêm mais água de hidratação e assim transitam pelo filtro mais lentamente. O restante do canal tem revestimento hidrofóbico. Baseado na comparação das seqüências de aminoácidos,

as propriedades estruturais dos canais de potássio são também aplicadas a outros tipos de canais.

D. Transporte passivo

O transporte passivo é o movimento de moléculas ou íons solúveis de um compartimento de maior concentração, através de uma membrana permeável, para um compartimento de menor concentração. O processo não necessita de energia. Os mais simples transportadores de membrana podem ser classificados de acordo com o número de moléculas transportadas.

O transporte passivo inclui dois sistemas: difusão simples e difusão facilitada.

1. Difusão simples. Cada soluto, impulsionado por movimento molecular aleatório, difunde-se através da membrana de acordo com seus respectivos gradientes de concentração – de um compartimento de maior concentração para um compartimento de menor concentração. O caráter hidrofóbico das moléculas é um fator importante para seu transporte através da membrana, uma vez que a bicamada lipídica é hidrofóbica. Em geral, quanto maior o gradiente de concentração, mais rápida a velocidade de difusão do soluto. A difusão de moléculas pequenas apolares (como O_2, N_2 e CO_2) através da membrana é proporcional aos seus gradientes de concentração. Moléculas polares não-carregadas (como uréia, etanol e pequenos ácidos orgânicos) deslocam-se através das membranas sem o auxílio de proteínas.

2. Difusão facilitada. Transporte de certas moléculas grandes ou polares (como aminoácidos e açúcares) ocorre através de canais especiais ou moléculas transportadoras. Os canais são proteínas transmembrana semelhantes a um túnel. Cada tipo é designado pelo transporte de um soluto específico. Muitos canais são controlados quimicamente ou por voltagem. Os canais quimicamente regulados abrem ou fecham em resposta a sinais químicos específicos. Por exemplo, o canal iônico por onde se movimenta o Na^+ no receptor nicotínico da acetilcolina (encontrada nas membranas das células plasmáticas dos músculos) se abre quando a acetilcolina se liga. O Na^+ é arremetido para o interior da célula com redução do potencial elétrico transmembrana que causa *despolarização*. A despolarização promovida pela acetilcolina abre o canal vizinho de sódio (chamado de *canal de Na^+dependente de voltagem*). A *repolarização,* o restabelecimento do potencial de membrana, inicia com a difusão de íons K^+ para fora da célula através de *canais de K^+ dependentes de voltagem.* A difusão de íons K^+ para o exterior da célula torna o interior menos positivo, ou seja, mais negativo.

Outra forma de difusão facilitada envolve proteínas chamadas transportadoras ou *permeases.* No transporte mediado por transportadores, um soluto específico liga-se ao transportador em um lado da membrana e promove uma alteração conformacional no transportador. O soluto é então translocado através da membrana e liberado. Nos eritrócitos o *transportador de glicose* é um exemplo bem caracterizado de transportador passivo. Ele permite que a D-glicose difunda através da membrana da célula para ser utilizada na glicólise e pela via das pentoses–fosfato. A difusão facilitada aumenta a velocidade que certos solutos se movem em direção do seu

gradiente de concentração. Esse processo não pode causar o aumento líquido na concentração do soluto em um lado da membrana.

E. Transporte ativo

É o movimento de substâncias contra gradiente de concentração ou eletroquímico. O processo de transporte necessita de aporte de energia. Os sistemas mais importantes de transporte ativo são a *(Na^+–K^+)–ATPase* (também chamada ATPase transportadora de íons ou bomba de Na^+–K^+), e a *Ca^{2+}–ATPase* (bomba de Ca^+), criam e mantêm gradientes eletroquímicos através da membrana plasmática e através das membranas das organelas. A (Na^+–K^+)–ATPase e a Ca^{2+}–ATPase usam a energia da hidrólise do ATP na sua translocação ativa de substâncias. As duas formas de transporte ativo são: *transporte ativo primário* e *transporte ativo secundário*.

1. Transporte ativo primário. Os transportadores ativos primários utilizam o ATP diretamente como fonte de energia para impulsionar o transporte de íons e moléculas. As diferentes concentrações de Na^+ e K^+ no interior e exterior das células eucarióticas são mantidas por mecanismos antiporte pela enzima *(Na^+–K^+)–ATPase*, encontrada em todas as membranas celulares. Em cada ciclo, a (Na^+–K^+)–ATPase hidrolisa 1 ATP e bombeia 3 íons Na^+ para o exterior e 2 íons K^+ para o interior das células.

Uma proteína transportadora ativa, a *P–glicoproteína*, parece exercer papel fundamental na resistência de células tumorais a quimioterápicos. A resistência multifármaco é a causa dominante do malogro no tratamento clínico do câncer humano. A P-glicoproteína é uma glicoproteína integral de membrana abundante em membranas plasmáticas de células resistentes a fármacos. Usando o ATP como fonte de energia, a P-glicoproteína bombeia uma grande variedade de compostos tais como fármacos, para fora das células, contra gradiente de concentração. Desse modo, a concentração de fármacos no citosol é mantida em níveis baixos para evitar a morte da célula. A função fisiológica normal da P-glicoproteína parece ser a remoção de compostos hidrofóbicos tóxicos da dieta.

2. Transporte ativo secundário. É dirigido por um gradiente eletroquímico transmembrânico de Na^+ ou H^+ utilizado para o deslocamento. O transporte ativo ascendente de um soluto é acoplado ao transporte descendente de um segundo soluto que foi concentrado pelo transporte primário ativo. Por exemplo, o gradiente de Na^+ criado pela (Na^+–K^+)–ATPase é usado no túbulo renal e células intestinais para transportar a D-glicose por um simporte Na^+-glicose; o transporte ativo de glicose, assim, desfaz o gradiente de concentração do Na^+, que é restabelecido pela (Na^+–K^+)–ATPase. (Figura 9.7). Portanto, a hidrólise do ATP indiretamente fornece a energia necessária à captação de glicose, sendo associada pelo gradiente iônico do Na^+.

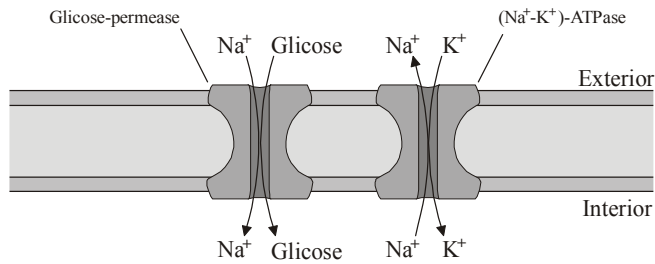



Figura 9.16

Transporte ativo secundário. A (Na^+-K^+)–ATPase gera um gradiente de íon sódio (estabelecido por um transporte ativo primário) que direciona o transporte ativo secundário da glicose nas células epiteliais do intestino. A glicose é transportada juntamente com o Na^+ através da membrana plasmática para dentro da célula epitelial.

Existem outras proteínas transprtadoras que necessitam ATP para bombear substâncias como prótons e íons Ca^{2+} contra gradientes de concentração. Por exemplo, a *Ca^{2+}–ATPase* é um sistema de transporte ativo que bombeia íons cálcio para dentro do retículo endoplasmático especializado (retículo sarcoplasmático) das células musculares. O cálcio é mantido em baixas concentrações no citosol pela hidrólise do ATP em ADP e P_i que direciona o íon cálcio para o retículo sarcoplasmático através da membrana e contra um gradiente eletroquímico.

Defeitos no mecanismo de transporte da membrana podem provocar sérias conseqüências. Um exemplo da disfunção do transporte ocorre na fibrose cística. A *fibrose cística*, doença autossômica recessiva, é provocada pela falta ou defeito em uma glicoproteína de membrana, denominada *regulador da condutividade transmembrânica da fibrose cística* (CFTR), que atua como um canal para íons cloreto nas células epiteliais e é um membro da família de proteínas chamadas transportadores da caixa ATP–ligante, ABC (*A*TP *b*inding *c*assete). O canal para íons cloreto é vital para a absorção de sal (NaCl) e água através das membranas plasmáticas das células epiteliais em tecidos como pulmões, fígado, intestino delgado e glândulas sudoríparas. O transporte de cloretos ocorre quando moléculas sinalizadoras abrem os canais CFTRCl^- na superfície das membranas das células epiteliais. Na fibrose cística, o defeito dos canais CFTR resulta na retenção de Cl^- no interior das células. Um muco espesso ou outras formas de secreção causa a excessiva captação de água devido à pressão osmótica. As características encontradas na fibrose cística são: doença pulmonar (obstrução do fluxo de ar e infecções bacterianas crônicas) e insuficiência pancreática (impedimento da produção de enzimas digestivas que pode resultar em deficiência nutricional severa). A mutação mais comum que causa a fibrose cística é a deleção do resíduo Phe^{508} da CFTR, o que causa um enovelamento defeituoso e a inserção de uma proteína mutante na membrana plasmática.

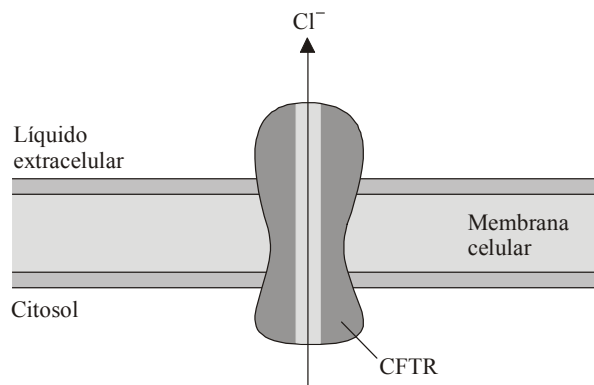
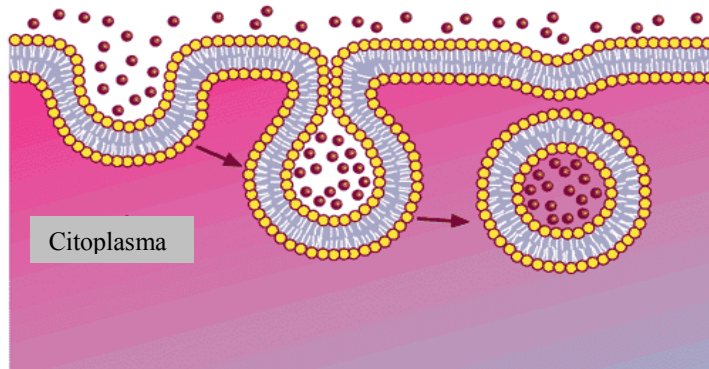



Figura 9.17
Regulador da condutividade transmembrânica da fibrose cística (CFTR). A proteína CFTR está posicionada na membrana celular para formar um canal para o Cl^- sair da célula.

H. Endocitose e exocitose

Os mecanismos de transporte descritos acima ocorrem em um fluxo de moléculas ou íons através de membranas intactas. As células também necessitam importar e exportar moléculas muito grandes para serem transportadas via poros, canais ou proteínas transportadoras. Os procariontes possuem sistemas especializados multicomponentes em suas membranas que permitem secretar certas proteínas (muitas vezes toxinas ou enzimas) para o meio extracelular. Na maioria das células eucarióticas, certos componentes de grande tamanho transitam para dentro e para fora da célula por *endocitose* e *exocitose,* respectivamente. Nos dois casos, o transporte envolve a formação de um tipo especializado de vesícula lipídica.

1. Endocitose. A endocitose é um mecanismo para o transporte de componentes do meio circundante para o interior do citoplasma. A endocitose mediada por receptores, inicia com o seqüestro de macromoléculas por proteínas receptoras específicas presentes nas membranas plasmáticas das células. A membrana então se invagina, formando uma vesícula que contêm as moléculas ligadas. Uma vez dentro da célula, a vesícula, sem o seu revestimento, funde-se com *endossomos* (outro tipo de vesícula) e a seguir com um lisossomo. No interior do lisossomo, o material endocitado e o receptor são degradados. Alternativamente, o ligante, o receptor, ou ambos podem ser reciclados entre a membrana plasmática e o compartimento endossômico. A *fagocitose* é um caso especial de endocitose.

A

B

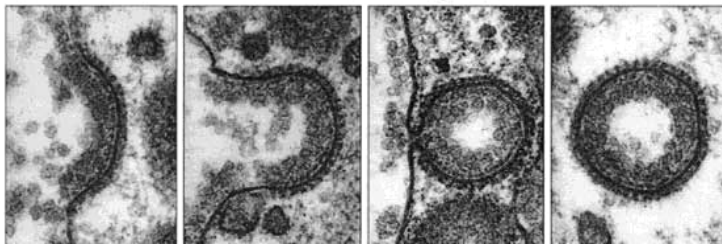



Figura 9.18
A. A endocitose inicia com o seqüestro de macromoléculas ela membrana plasmática da célula. A membrana invagina, formando uma vesícula que contêm as moléculas ligadas (figura superior). B. Microfotografia eletrônica da endocitose.

2. Exocitose. A exocitose é o inverso da endocitose. Durante a exocitose, os materiais destinados à secreção são encapsulados em vesículas no aparelho de Golgi. As vesículas podem fundir com a membrana plasmática, liberando o seu conteúdo para o meio circundante. Os zimogênios das enzimas digestivas são exportados pelas células pancreáticas desse modo.

Membrana plasmática

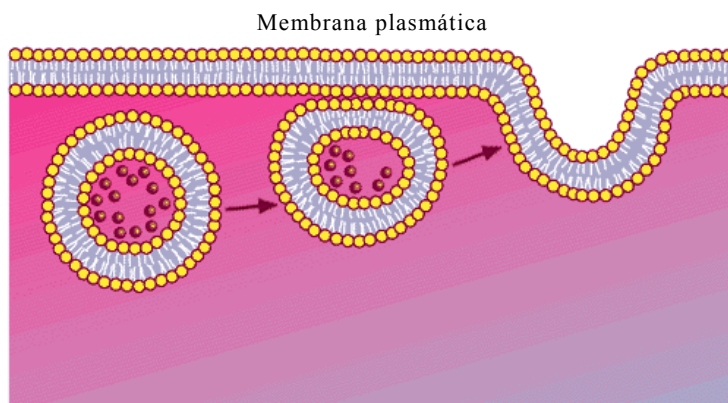



Figura 9.19
Mecanismo da exocitose

9.5 Fusão de membranas

Uma importante característica das membranas biológicas é a sua capacidade de se fundir com uma outra membrana sem perder a sua integridade. As proteínas integrais necessárias para as fusões de membranas são chamadas SNAREs (soluble *N*–ethylmaleimide–sensitive-factor attachment protein receptor) que exercem funções no direcionamento, ancoragem e fusão de vesícula.

A fusão é um processo multi-etapas que inicia com a formação de bastões em forma de grampo que aproximam as proteínas ligadas às membrana-alvo (por exemplo, a membrana da vesícula) a outra (por exemplo, a membrana plasmática). Várias proteínas parecem participar na junção das duas membranas preparando-as para a fusão.

Resumo

1. Os lipídeos são biomoléculas com grande variedade estrutural. São solúveis em solventes não-polares. São: ácidos graxos e seus derivados, triacilgliceróis, ésteres graxos, fosfolipídeos, lipoproteínas, esfingolipídeos e isoprenóides.
2. Os ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos que ocorrem principalmente como triacilgliceróis, fosfolipídeos e esfingolipídeos. Os eicosanóides são um grupo de moléculas hormônio−like derivados de ácidos graxos de cadeias longas. Os eicosanóides incluem as prostaglandinas, tromboxanos e leocotrienos.
3. Os triacilgliceróis são ésteres de glicerol com três moléculas de ácidos graxos. Os triacilgliceróis (chamadas gorduras) são sólidos a temperatura ambiente (possuem principalmente ácidos graxos saturados). Os líquidos a temperatura ambiente (ricos em ácidos graxos insaturados) são denominados óleos. Os triacilgliceróis, a principal forma de transporte e armazenamento de ácidos graxos, são uma importante forma de armazenamento de energia em animais. Nas plantas são armazenados nas frutas e sementes.
4. Os fosfolipídeos são componentes estruturais das membranas. Existem dois tipos de fosfolipídeos: glicerofosfolipídeos e esfingomielinas.
5. Os esfingolipídeos são também componentes importantes das membranas celulares de animais e vegetais. Contêm um aminoálcool de cadeia longa. Nos animais esse álcool é a esfingosina. A fitoesfingosina é encontrada nos esfingolipídeos vegetais. Os glicolipídeos são esfingolipídeos que possuem grupos carboidratos e nenhum fosfato.
6. Os isoprenóides são moléculas que contêm unidades isoprênicas de cinco carbonos repetidas. Os isoprenóides consistem de terpenos e esteróides.
7. As lipoproteínas plasmáticas transportam moléculas de lipídeos através da corrente sangüínea de um órgão para outro. Elas são classificadas de acordo com a densidade. Os quilomícrons são lipoproteínas volumosas de densidade extremamente baixa que transportam os triacilgliceróis e ésteres de colesteril da dieta, do intestino para o tecido adiposo e músculo esquelético. As VLDL são sintetizadas no fígado e transportam lipídeos para os tecidos. No transporte pela corrente sangüínea, elas são convertidas em LDL. As LDL são captadas pelas células por endocitose após ligação a receptores específicos localizados na membrana plasmática. As HDL, também produzidas pelo fígado, captam o colesterol das membranas celulares e outras partículas lipoprotéicas. As LDL tem importante papel no desenvolvimento da aterosclerose.
8. De acordo com o modelo do mosaico fluído, a estrutura básica das membranas biológicas é uma bicamada lipídica na qual as proteínas

flutuam. Os lipídeos da membrana (a maioria dos quais são fosfolipídeos) são os principais responsáveis pela fluidez, permeabilidade seletiva e a capacidade de auto-selar das membranas. As proteínas das membranas geralmente definem as funções biológicas específicas. Dependendo de sua localização, as proteínas de membranas podem ser classificadas como integrais, periféricas ou ligadas a lipídeos. Exemplos de funções nas quais as proteínas de membranas estão envolvidas incluem o transporte de moléculas e íons e a ligação de hormônios e outros sinais metabólicos extracelulares.

9. Algumas moléculas pequenas ou hidrofóbicas podem difundir através da bicamada lipídica. Poros, canais iônicos transportadores passivos e ativos mediam o movimento de íons e moléculas polares através das membranas. As macromoléculas deslocam-se para dentro e para fora das células por endocitose ou exocitose, respectivamente.

Referências

HORTON, H. R., MORAN, L. A., OCHS, R. S., RAWN, J. D., SCRIMGEOUR, K. G. **Principles of biochemistry.** 3 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2002. p. 264-303.

McKEE, T., McKEE, J.R. **Biochemistry:** The molecular basis of live. 3 ed. New York: McGraw-Hill, 2003. p. 200-33.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger:** Princípios de bioquímica. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 280-339.

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica.** Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 195-218.

Capítulo

10

VALTER T. MOTTA

BIOQUÍMICA BÁSICA

Metabolismo dos Lipídeos

10

Metabolismo dos Lipídeos

Objetivos

1. Descrever a digestão e absorção dos lipídeos.
2. Descrever o transporte intracelular de ácidos graxos através da membrana mitocondrial.
3. Descrever a β–oxidação dos ácidos graxos usando um esquema metabólico.
4. Calcular o balanço energético da oxidação total de um mol de ácido graxo.
5. Descrever a regulação da oxidação dos ácidos graxos.
6. Descrever a formação e degradação de corpos cetônicos e seu papel na inanição e diabete melito.
7. Descrever o transporte de grupos acetil da mitocôndria para o citosol.
8. Descrever as reações de biossíntese de ácidos graxos pelo complexo ácido graxo sintase.
9. Descrever o controle da biossíntese dos ácidos graxos.
10. Reconhecer que a glicose é a principal fonte de acetil–CoA, de oxaloacetato e de NADPH para a biossíntese dos ácidos graxos.
11. Identificar os processos de formação de ácidos graxos de mais de 16 átomos de carbono e de obtenção de ácidos graxos insaturados.
12. Descrever a síntese de triglicerídeos.
13. Descrever o metabolismo dos lipídeos de membrana.
14. Descrever o metabolismo do colesterol.
15. Descrever a formação de eicosanóides.

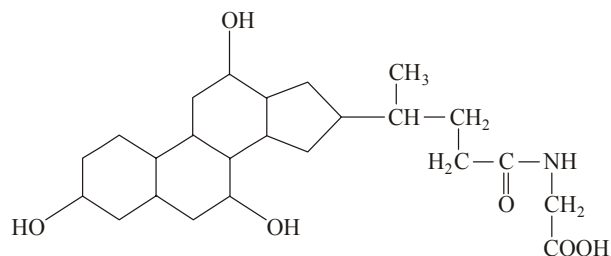
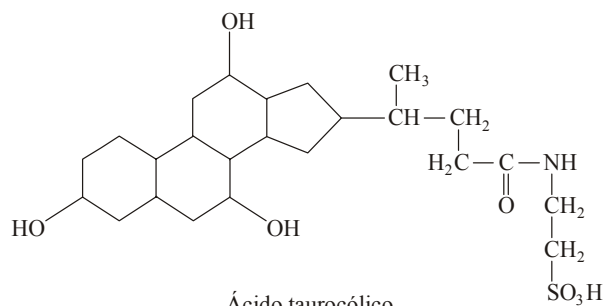
A acetil–CoA, uma molécula de "alta energia" composta de coenzima A e um grupo acetil, exerce papel fundamental no metabolismo dos lipídeos. Em muitos processos metabólicos relacionados aos lipídeos, a acetil–CoA atua como substrato ou produto. Por exemplo, a acetil–CoA não usada imediatamente para a geração de energia celular é empregada na síntese dos ácidos graxos. Quando os ácidos graxos de cadeia longa são oxidados para liberar energia, forma-se acetil–CoA. Três moléculas de acetil–CoA são combinadas para formar isopentenil pirofosfato, a molécula construtora de isoprenóides nas reações sintéticas. Assim, moléculas tão diversas como terpenos e esteróides encontrados em animais e plantas são sintetizadas a partir de acetil–CoA. Pelo papel importante dos lipídeos na geração de energia e na formação de materiais

estruturais para as células vivas, o seu metabolismo e os seus mecanismos de controle são descritos nesse capítulo.

10.1 Digestão e absorção dos lipídeos

Os lipídeos ingeridos são constituídos principalmente por triacilgliceróis (90% do total) e, em menor grau, glicerofosfolipídeos, colesterol, ésteres de colesteril e ácidos graxos livres. No trato gastrointestinal, os lipídeos são emulsificados, digeridos por enzimas hidrolíticas e absorvidos pelas células da mucosa intestinal.

Em razão da pouca solubilidade em meio aquoso, os lipídeos se agregam em grandes complexos dificultando a hidrólise enzimática e a absorção intestinal. Esses obstáculos são contornados pelo emprego de agentes emulsificantes que aumentam a interface lipídio-água permitindo a ação das enzimas intestinais hidrossolúveis, também como a "solubilização" dos produtos de hidrólise.

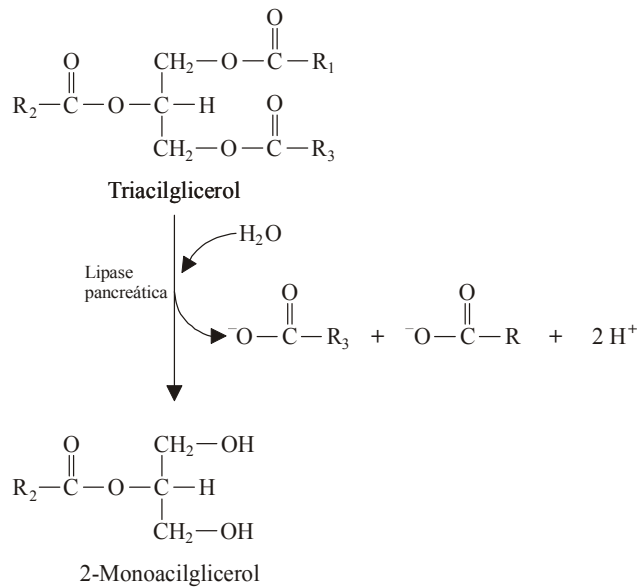
Os lipídeos da dieta são emulsificados no duodeno pela ação detergente dos *sais biliares*. Os sais biliares são moléculas anfipáticas sintetizadas pelo fígado a partir do colesterol e temporariamente armazenados na vesícula biliar e liberados no intestino delgado após a ingestão de gorduras. Os principais são o *glicocolato de sódio* e o *taurocolato de sódio* derivados dos ácidos glicocólico e taurocólico, respectivamente (*ver* Seção 10.7.C). A emulsificação é possível pela natureza anfipática dos sais biliares. A porção polar das moléculas de sais biliares, interage com a água, enquanto o grupo não-polar interage com os lipídeos hidrofóbicos. Desse modo, os lipídeos são finamente dispersos no meio aquoso.

Ácido glicocólico

Ácido taurocólico

Três enzimas hidrolíticas são encontradas no suco pancreático secretado no duodeno: *lipase–pancreática, colesterol–esterase* e *fosfolipase* A_2.

A *lipase–pancreática* catalisa a hidrólise dos triacilgliceróis com a formação de 2–monoglicerol e 2 ácidos graxos:

```
                                   O
                                   ‖
         O        CH2—O—C—R1
         ‖        |
R2—C—O—C—H        O
                  |                ‖
                  CH2—O—C—R3

        Triacilglicerol
              |   ↙ H2O
   Lipase     |
 pancreática  |         O                  O
              |         ‖                  ‖
              └──▶ ⁻O—C—R3   +   ⁻O—C—R   +   2 H⁺
              |
              ▼
         O        CH2—OH
         ‖        |
R2—C—O—C—H
                  |
                  CH2—OH

      2-Monoacilglicerol
```

A *colipase,* um co-fator protéico também produzido pelo pâncreas, é essencial na estabilização da lipase, não permitindo sua desnaturação ou inibição pelos sais biliares.

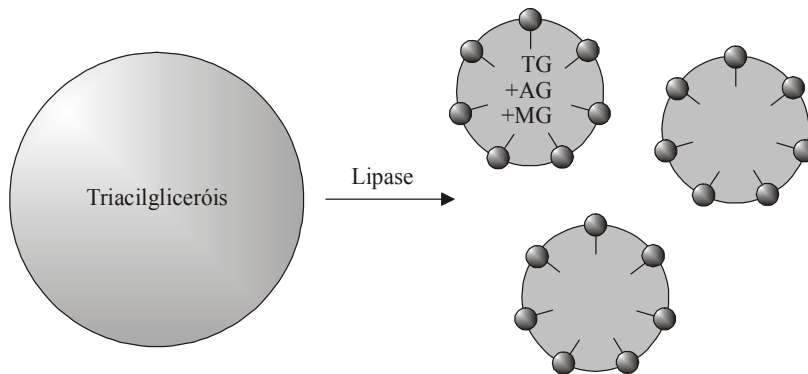
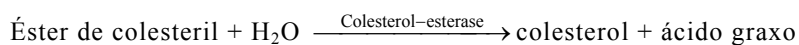



Figura 10.1.
Alterações no estado físico durante a digestão dos triacilgliceróis. (TG = triacilgliceróis, AG = ácidos graxos, MG = monoacilgliceróis).

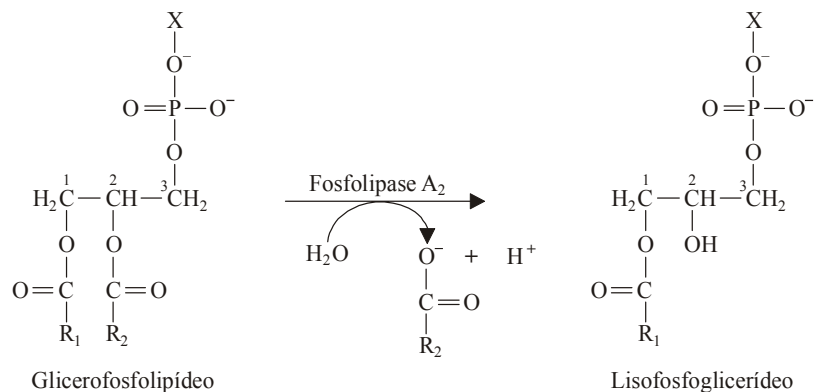
Os ésteres de colesteril ingeridos na dieta são emulsificados pelos sais biliares e, então, hidrolisados pela *colesterol–esterase* a colesterol e ácidos graxos livres:

$$\text{Éster de colesteril} + H_2O \xrightarrow{\text{Colesterol–esterase}} \text{colesterol} + \text{ácido graxo}$$

A *fosfolipase* A_2, secretada na forma de pró-enzima e ativada pela tripsina, catalisa a hidrólise dos resíduos de ácidos graxos presentes

na posição 2 dos fosfoglicerídeos, formando 1-acil lisofosfoglicerídeos:

Fosfolipase A_2

Glicerofosfolipídeo

Lisofosfoglicerídeo

O suco pancreático contém outras esterases menos específicas que atuam sobre monoacilgliceróis e outros ésteres lipídicos, como os de vitamina A com ácidos carboxílicos.

Os produtos da lipólise são incorporados a *miscelas mistas* com sais biliares conjugados. As miscelas são os principais veículos no movimento dos ácidos graxos, monoacilgliceróis e glicerol da luz para a superfície das células da mucosa intestinal onde ocorre a absorção. Na ausência de sais biliares, a absorção dos lipídeos é drasticamente reduzida com a presença excessiva de gorduras nas fezes (esteatorréia). A esteatorréia ocorre também por deficiência de lipase pancreática ou defeitos de absorção ao nível da mucosa intestinal e outras condições que comprometem a absorção das gorduras.

Na célula da mucosa intestinal, o destino dos ácidos graxos absorvidos é determinado pelo comprimento de suas cadeias carbonadas. Ácidos graxos de cadeia curta (2-10 átomos de carbono) são hidrossolúveis, sendo diretamente liberados para o sangue portal sem alterações e transportados ao fígado unidos à albumina. Os ácidos graxos de cadeia longa são convertidos novamente em triacilgliceróis e agrupados com o colesterol, fosfolipídeos e proteínas específicas (apolipoproteínas) que os tornam hidrossolúveis. Esses agregados lipoprotéicos são denominados *quilomícrons* e são liberados para os vasos linfáticos intestinais e a seguir para o sangue.

A *lipoproteína-lipase* (sintetizada pelo músculo esquelético e cardíaco, glândula mamária de lactantes e tecido adiposo) ligada à superfície endotelial dos capilares sangüíneos, converte os triacilgliceróis dos quilomícrons em ácidos graxos e glicerol. Esses compostos são captados por vários tecidos, principalmente, o adiposo e o muscular. A lipoproteína-lipase é ativada por ligação a uma proteína componente dos quilomícrons, a apoproteína C–II.

A concentração de ácidos graxos livres no organismo é baixa, pois suas moléculas são detergentes (formam micelas) e podem romper as membranas celulares. Após entrar nas células, provavelmente com o auxilia de proteínas, os ácidos graxos podem ser (1) oxidados para gerar energia, (2) armazenados como triacilgliceróis ou (3) usados para a síntese de membranas.

Muitos ácidos graxos são empregados pelo fígado e células musculares, especialmente no músculo cardíaco, que prefere utilizar ácidos graxos mesmo quando houver disponibilidade de carboidratos.

10.2 Mobilização dos triacilgliceróis (lipólise)

Os ácidos graxos de fontes alimentares e sintetizados no organismo, são esterificados a triacilgliceróis, transportados via corrente circulatória e armazenados como gotículas líquidas no citoplasma das células do tecido adiposo. Os triacilgliceróis constituem a fonte mais concentrada de energia química do corpo. Durante o jejum, exercício vigoroso e em resposta ao estresse, os triacilgliceróis armazenados nos adipócitos são hidrolisados em ácidos graxos e glicerol pela ação da *lipase hormônio-sensível.*

Os hormônios *adrenalina* (epinefrina) e *glucagon* secretados em resposta a baixos teores de glicemia, ativam a adenilil−ciclase na membrana plasmática dos adipócitos (Figura 10.2). A *adenilil−ciclase* transforma ATP em AMPc (AMP cíclico) (*ver* Capítulo 12). A *proteína−cinase dependente de AMPc*, fosforila e, assim, ativa a lipase. Os triacilgliceróis são hidrolizados em ácidos graxos e glicerol. Elevados teores de glicose e de insulina sangüínea exercem atividades opostas, acumulando triacilgliceróis no tecido adiposo.

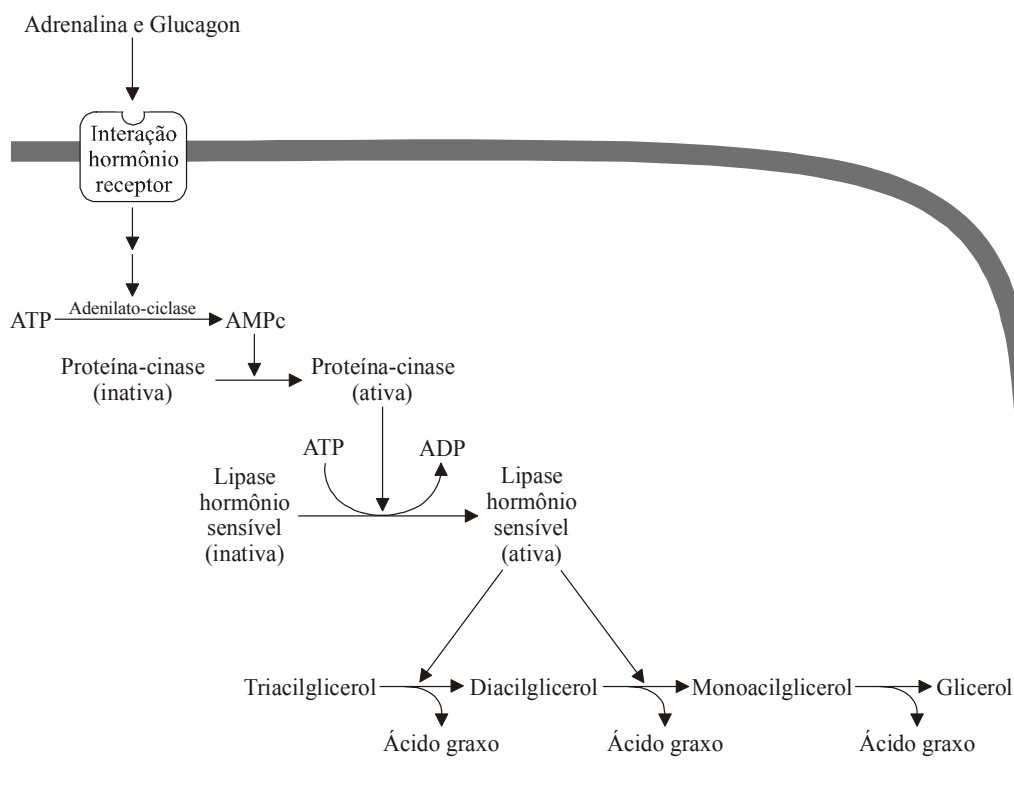



Figura 10.2
Mobilização de ácidos graxos dos adipócitos

O glicerol é conduzido ao fígado e fosforilado a glicerol−6−fosfato pela *glicerol−cinase* (*ver* seção 10.5.F). A glicerol−3−fosfato é oxidada pela via glicolítica ou usada na síntese de triacilgliceróis, fosfolipídeos ou glicose (gliconeogênese).

Os ácidos graxos liberados dos adipócitos são transportados pelo sangue ligados à albumina sérica para diferentes tecidos nos quais servirão como combustíveis. Difundem-se para o interior das células por uma proteína transportadora de ácidos graxos presente na membrana plasmática em processo associado ao transporte ativo do sódio. As células variam grandemente em suas capacidades de transporte e utilização dos ácidos graxos.

10.3 Oxidação dos ácidos graxos

Os ácidos graxos são degradados por oxidação em uma seqüência repetitiva de reações que produzem moléculas de acetil−CoA e liberam energia. O mecanismo ocorre principalmente na matriz mitocondrial das células animais, sendo conhecido como *β−oxidação* (existe também a β−oxidação nos peroxissomos) na qual os ácidos graxos são degradados pela remoção de unidades de dois carbonos (acetil−CoA).

O grau de utilização dos ácidos graxos varia de acordo de tecido para tecido e depende do estado metabólico do organismo (condição absortiva, pós−prandial, alimentado, jejum prolongado, inanição, exercício, repouso, etc). Durante o jejum prolongado, a maioria dos tecidos é capaz de utilizar os ácidos graxos como fonte de energia. O tecido nervoso e os eritrócitos não empregam os ácidos graxos como combustível.

Nas mitocôndrias, os ácidos graxos são degradados pela oxidação no β-carbono (C3) em um grupo ceto (C=O) com a remoção sucessiva de fragmentos de dois carbonos na forma de acetil−CoA, posteriormente oxidada a CO_2 no ciclo do ácido cítrico. Em cada ciclo da β−oxidação, forma-se um mol de acetil−CoA, um de $FADH_2$ e um de NADH. No fígado, a energia liberada pela β-oxidação é empregada para dirigir a gliconeogênese.

A. Ativação de ácidos graxos

Antes de serem oxidados, os ácidos graxos são ativados pela adição de CoA para formar acil−CoA graxo. O grupo carboxila dos ácidos graxos de cadeia longa reage com o grupo sulfidrílico da CoA em presença de ATP para produzir acil−CoA, AMP e pirofosfato inorgânico (PP_i) em reação catalisada por uma família de enzimas, as *acil-CoA−sintases* (*tiocinases*) que estão associadas ao retículo endoplasmático ou com a membrana mitocondrial externa.

$$R{-}COO^- + {}^-O{-}P(O)(O^-){-}O{-}P(O)(O^-){-}O{-}P(O)(O^-){-}O{-}\text{Adenosina}$$

Ácido graxo

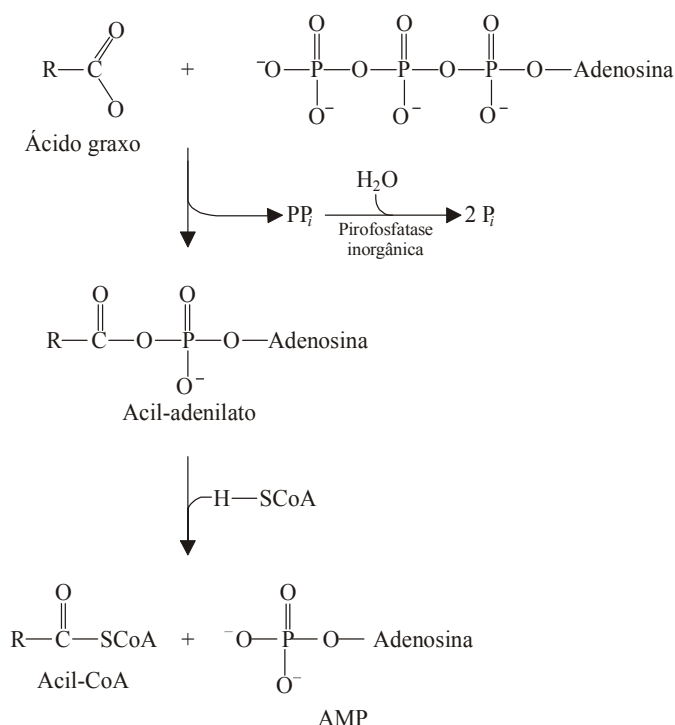
$$\downarrow \quad PP_i \xrightarrow[\text{Pirofosfatase inorgânica}]{H_2O} 2\,P_i$$

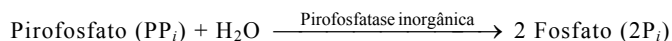
$$R{-}C(O){-}O{-}P(O)(O^-){-}O{-}\text{Adenosina}$$

Acil-adenilato

$$\downarrow \quad H{-}SCoA$$

$$R{-}C(O){-}SCoA + {}^-O{-}P(O)(O^-){-}O{-}\text{Adenosina}$$

Acil-CoA — AMP

O processo envolve a clivagem do ATP em pirofosfato inorgânico (PP_i) e AMP, em lugar de ADP e P_i. A formação de acil−CoA é favorecida pela hidrólise de duas ligações de "alta energia" do ATP, pois o pirofosfato inorgânico é hidrolisado subsequentemente pela *pirofosfatase inorgânica:*

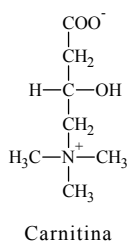
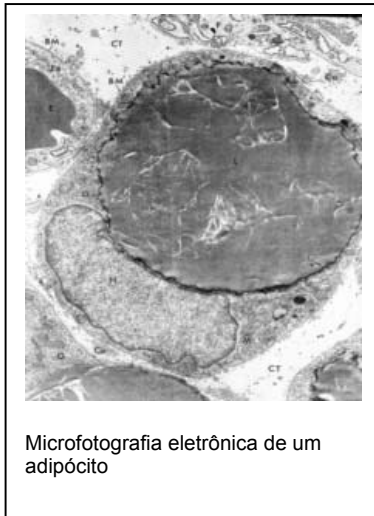
$$\text{Pirofosfato } (PP_i) + H_2O \xrightarrow{\text{Pirofosfatase inorgânica}} 2 \text{ Fosfato } (2P_i)$$

Na reação total duas ligações fosfato de "alta energia" são consumidas (hidrólise do ATP e do pirofosfato), enquanto somente uma é formada (acil−CoA), tornando o processo espontâneo e irreversível.

B. Transporte do grupo acil para as mitocôndrias

Os ácidos graxos são ativados no citosol, mas a oxidação ocorre na mitocondria. Como a membrana mitocondrial interna é impermeável aos acil−CoA graxos de cadeia longa, os grupos acil entram na mitocôndria por um sistema de lançadeira que emprega a *carnitina* (4−trimetilamino−3−hidroxibutirato) como transportador. A carnitina é um composto dipolar derivado do aminoácido lisina.

$$COO^-{-}CH_2{-}CH(OH){-}CH_2{-}N^+(CH_3)_3$$

Carnitina

Microfotografia eletrônica de um adipócito

Duas enzimas participam das reações: a carnitina–acil-transferase I e a carnitina–acil–transferase II. A *carnitina–acil-transferase I* localizada na superfície externa da membrana mitocondrial interna, catalisa a transferência do grupo acil da CoA para o grupo hidroxila da carnitina, formando acil-carnitina.

A reação é reversível com pequena variação de energia livre-padrão, indicando que a energia contida na acil–CoA não é dissipada pela formação da acil-carnitina. Essa última atravessa a membrana e o grupo acil é transferido da carnitina para a CoA presente na matriz mitocondrial em reação catalisada pela *carnitina–acil–transferase II* encontrada na superfície interna da membrana mitocondrial interna:

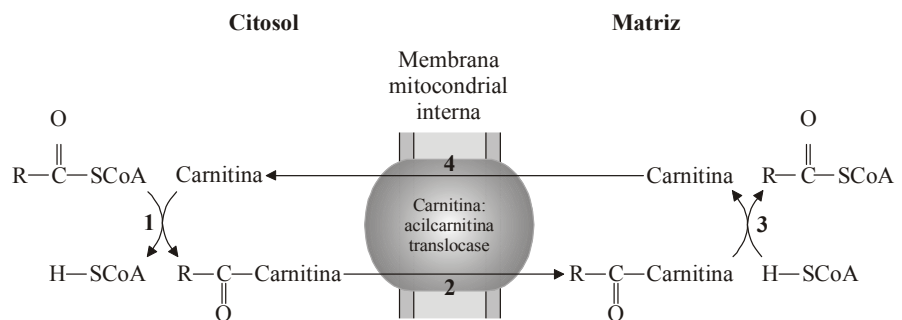



Figura 10.3
Transporte dos ácidos graxos para a matriz mitocondrial. (1) O grupo acila da acil–CoA citosólica é transferido para a carnitina, liberando CoA. (2) A acil–carnitina é transportada para a matriz com a subseqüente transferência do grupo acil para a molécula de CoA intramitocondrial. (3) O grupo acil é transferido para a molécula de CoA do conjunto mitocondrial. (4) A carnitina retorna ao citosol.

A acil-carnitina é lançada para o interior da mitocôndria por um transportador protéico específico chamado *carnitina: acilcarnitina–translocase.* A carnitina retorna ao espaço intermembranas também pela translocase.

C. Reações da β-oxidação dos ácidos graxos

Na β-oxidação, a acil–CoA graxo é oxidado em um ciclo repetido de quatro reações enzimáticas: (1) formação de ligação dupla trans–α,β. (2) Hidratação da ligação dupla, (3) desidrogenação da L–β–hidroacil–CoA e (4) formação de acetil–CoA.

1. Formação de dupla ligação trans–α,β. Uma vez na matriz mitocondrial, o acil–CoA graxo é oxidado no carbono β (remoção de átomos de hidrogênio dos carbonos α e β) por *acil–CoA–desidrogenases* que contém FAD, formando dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 em configuração *trans* α,β (*trans*–Δ^2–enoil–CoA). Quando a dupla ligação é formada, os elétrons do acil-CoA graxo são transferidos para o FAD para produzir o $FADH_2$ que doa o par de elétrons para a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, por meio da *flavoproteína de transferência de elétrons* (ETF), para a ubiquinona (Q) pela ação da *ETF:ubiquinona–oxidorredutase* com a produção de 1,5 ATP.

2. Hidratação da ligação dupla. A adição de uma molécula de água à dupla ligação da *trans*–Δ^2–enoil–CoA forma o L isômero da β–hidroacil–CoA em reação catalisada por *enoil–CoA–hidratases* (*crotonases*).

3. Desidrogenação da L–β–hidroacil–CoA. A enzima *L–β–hidroxiacil–CoA–desidrogenase* NAD^+ dependente é específica para os L–isômeros de substratos com diferentes comprimentos de cadeia, promovendo a produção de β–cetoacil–CoA. O NADH formado transfere o par de elétrons para a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons com a subseqüente geração de 2,5 ATP.

4. Formação de acetil–CoA. A reação final catalisada pela *tiolase* (acil–CoA–acetiltransferase), consiste em clivagem de um fragmento carboxiterminal de dois carbonos na forma de acetil–CoA da 3-cetoacil-CoA entre os C_α e C_β. O outro produto é uma acil–CoA contendo dois carbonos a menos que a acil–CoA original.

A acetil–CoA é convertida em CO_2 e H_2O via ciclo do ácido cítrico, enquanto a acil–CoA original encurtada em dois átomos de carbono sofre novo ciclo de quatro reações da β–oxidação. A repetição sucessiva das quatro reações do processo promove a degradação completa de ácido graxo com número par de átomos de carbono em moléculas de acetil–CoA.

$$CH_3-(CH_2)_n-\overset{\beta}{C}H_2-\overset{\alpha}{C}H_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-S-CoA$$ Acil— CoA graxo

Acetil-CoA desidrogenase: FAD → $FADH_2$ (FAD ← QH_2; $FADH_2$ → Q)

$$CH_3-(CH_2)_n-\overset{H}{\overset{|}{C}}=\underset{H}{\underset{|}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-S-CoA$$ Enoil—CoA

Enoil-CoA hidratase: H_2O

$$CH_3-(CH_2)_n-\underset{OH}{\underset{|}{C}H}-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-S-CoA$$ Hidroxiacil—CoA

β-Hidroxiacil-CoA desidrogenase: NAD^+ → $NADH + H^+$

$$CH_3-(CH_2)_n-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-S-CoA$$ Cetoacil—CoA

Tiolase: CoA—SH

$$CH_3-(CH_2)_n-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-S-CoA + CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-S-CoA$$

Acil-CoA graxo (2 atomos C menor) Acetil-CoA

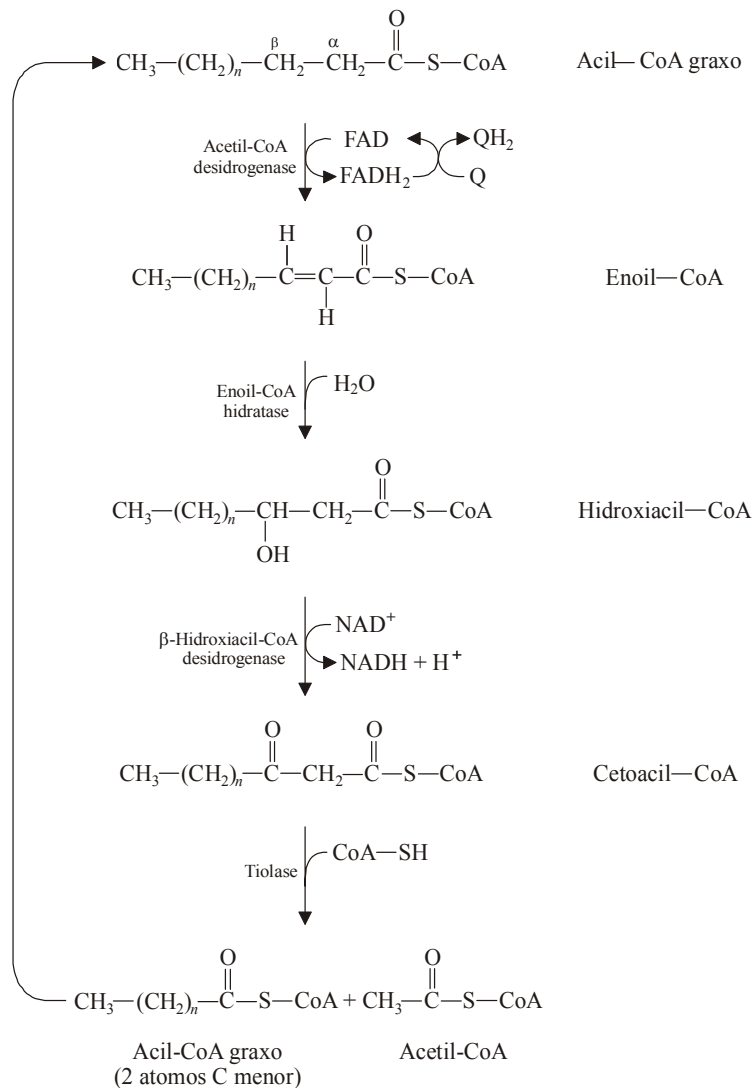



Figura 10.4
Reações da via de β–oxidação de ácidos graxos

Oxidação dos ácidos graxos nos perossissomos

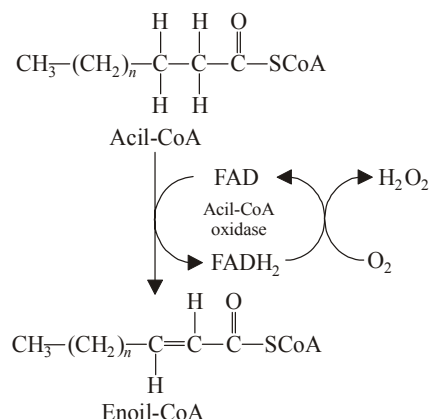
Nos *peroxissomos* (organelas subcelulares), ocorre pequena percentagem de β–oxidação dos ácidos graxos. Em animais, a β–oxidação peroxissomal encurta as cadeias de ácidos graxos com mais de 20 carbonos. Os ácidos graxos resultantes são degradados nas mitocôndrias pela β–oxidação. Em muitas células vegetais, a β–oxidação tem lugar predominantemente nos peroxissomos. (Os ácidos graxos não são fontes de energia importantes para os tecidos vegetais).

A β-oxidação peroxissomal difere da via mitocondrial somente na primeira etapa onde uma *acil–CoA–oxidase* catalisa a reação:

$$CH_3-(CH_2)_n-\underset{H}{\overset{H}{C}}-\underset{H}{\overset{H}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-SCoA$$

Acil-CoA

FAD → FADH$_2$ (Acil-CoA oxidase); O$_2$ → H$_2$O$_2$

$$CH_3-(CH_2)_n-\underset{H}{C}=\overset{H}{C}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-SCoA$$

Enoil-CoA

A enoil−CoA é idêntica ao produto da reação da mitocondrial catalisada pela acil−CoA−desidrogenase. No entanto, os elétrons removidos são transferidos diretamente para o oxigênio molecular para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e não para a ubiquinona. As reações seguintes são iguais as que ocorrem na mitocôndria.

Em algumas sementes em germinação, a β−oxidação ocorre nos *glioxissomos*. Os glioxissomos são peroxissomos especializados que contêm as enzimas do ciclo do glioxilato. A acetil−CoA derivada da β−oxidação glioxisomal é convertida em carboidratos pelo ciclo do glioxilato e gliconeogênese.

D. Produção de energia na oxidação dos ácidos graxos

Cada volta do ciclo de β−oxidação produz um NADH, um $FADH_2$ e uma acetil−CoA. A oxidação do NADH e do $FADH_2$ na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons acoplada à fosforilação oxidativa, produz 2,5 e 1,5 ATP, respectivamente. Cada molécula de acetil−CoA proveniente da β−oxidação é metabolizada a CO_2 e água no ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa, com a produção de 10 ATP. No entanto, na ativação do ácido graxo são consumidos dois equivalentes de ATP (um ATP é transformado em AMP + $2P_i$). Portanto, em condições fisiológicas, a oxidação completa de uma molécula de ácido palmítico (16 átomos de carbono) é dada pela reação:

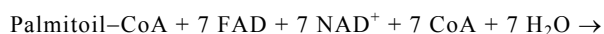
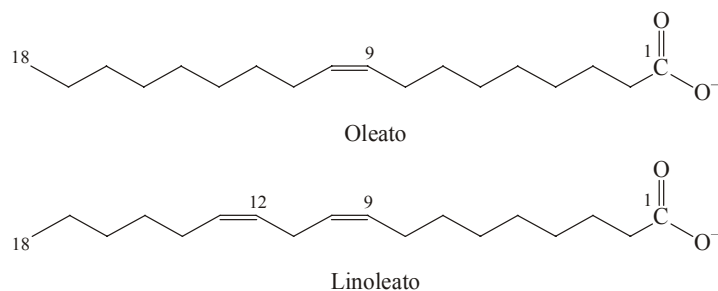
$$\text{Palmitoil–CoA} + 7\ FAD + 7\ NAD^+ + 7\ CoA + 7\ H_2O \rightarrow$$
$$8\ \text{Acetil–CoA} + 7\ FADH_2 + 7\ NADH + 7\ H^+$$

A produção de ATP a partir da β-oxidação do ácido palmítico pelo ciclo do ácido cítrico e da fosforilação oxidativa é resumida na Tabela 10.1.

Tabela 10.1 – Produção de ATP na oxidação de uma molécula de ácido palmítico

	ATP/mol
2 equivalentes de ATP (etapa de ativação)	−2
7 $FADH_2$ oxidados na CMTE (7 x 1,5)	10,5
7 NADH oxidados na CMTE (7 x 2,5)	17,5
8 acetil−CoA oxidados no ciclo do ácido cítrico (10 x 8)	80
Total:	106

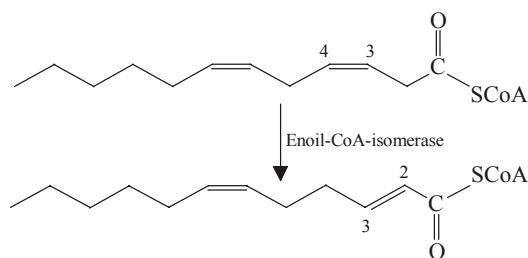
CMTE: cadeia mitocondrial transportadora de elétrons

E. Oxidação dos ácidos graxos insaturados

A via de oxidação dos ácidos graxos insaturados é a mesma dos ácidos graxos saturados até atingir a dupla ligação. O ácido oléico, $18{:}1^{\Delta 9}$ (oleato) e o ácido linoléico $18{:}2^{\Delta 9,12}$ (linoleato), são ácidos graxos comuns que contêm duplas ligações *cis* o que dificulta a ação das enzimas da β−oxidação.

Oleato

Linoleato

Para o linoleato, as primeiras três voltas da β−oxidação procedem de forma usual para liberar três moléculas de acetil−CoA. O acil−CoA que inicia a quarta volta tem dupla ligação entre C3 e C4 (originalmente a dupla ligação era C9 e C10). Além disso, a molécula é um *cis* enoil−CoA que não permite a ação da enoil−CoA−hidratase (enzima que catalisa a etapa 2 da β−oxidação) que reconhece somente a configuração *trans*. Esse obstáculo metabólico é removido pela enzima *enoil−CoA−isomerase*, que converte a dupla ligação *cis* 3,4 em uma dupla ligação *trans* 2,3 para que a β−oxidação continue.

Enoil-CoA-isomerase

Um segundo obstáculo ocorre após a primeira reação da quinta etapa da β−oxidação. A *acil-CoA−desidrogenase* introduz a dupla

ligação entre C2 e C3, no entanto, a dupla ligação original entre C12 e C13 do linoato está agora na posição entre C4 e C5. O *dienoil-CoA* resultante não é um substrato apropriado para a enzima seguinte, a *enoil–CoA–hidratase* da β-oxidação. A dienoil–CoA sofre uma redução pela 2*,4–dienoil–redutase dependente de NADPH* para converter as suas duas duplas ligações em uma única dupla ligação *trans* 3,4 que é reconhecida pela enoil–CoA–hidratase e permite a reentrada do intermediário na via normal de β–oxidação e sua degradação em seis moléculas de acetil–CoA. O resultado final é a transformação do linoleato em nove moléculas de acetil–CoA

SCoA

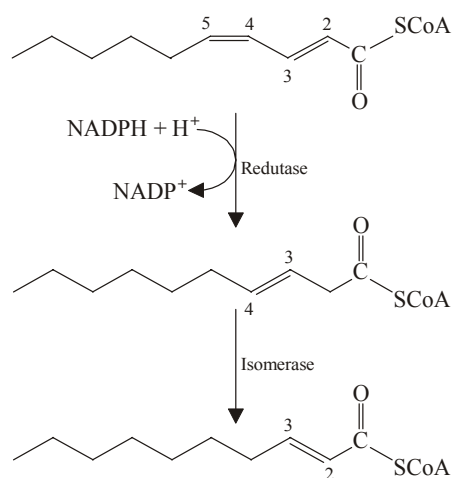
$NADPH + H^+$

Redutase

$NADP^+$

SCoA

Isomerase

SCoA

A oxidação de ácidos graxos insaturados produz menor número de ATP que os correspondentes ácidos graxos saturados. Quando a dupla ligação estiver presente não ocorre a etapa catalisada pela acil–CoA–desidrogenase ligada ao FAD. Além disso, a redutase NADPH–dependente consome 2,5 equivalentes de ATP na forma de NADPH (que é energeticamente equivalente ao NADH).

F. Oxidação de ácidos graxos de cadeia ímpar

Apesar de raros, os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono também são oxidados na via da β-oxidação com formação de moléculas sucessivas de acetil–CoA e um fragmento ω-terminal de três carbonos, a *propionil–CoA*. Este composto também é gerado na degradação oxidativa dos aminoácidos isoleucina, valina, metionina e treonina. Nas mitocôndrias de diversos tecidos, a propionil–CoA sofre carboxilização pela propionil–CoA–carboxilase em presença de biotina para produzir um intermediário de quatro átomos de carbono, a *D–metilmalonil–CoA*. Na etapa seguinte, a D–metilmalonil–CoA é epimerizada a L–metlmalonil–CoA pela enzima metilmalonil–CoA–epimerase. Pela ação da metilmalonil–CoA–mutase que requer a vitamina B_{12} como co–fator, a L–metilmalonil–CoA sofre um rearranjo intramolecular e forma *succinil–CoA*. A succinil–CoA entra diretamente no ciclo do ácido cítrico.

$CH_3-CH_2-C(=O)-SCoA$

Propionil-CoA

$\downarrow$ ATP + CO_2 → ADP + P_i (Propionil-CoA-carboxilase)

$^{-}O_2C-CH(CH_3)-C(=O)-SCoA$

(S)-Metilmalonil-CoA

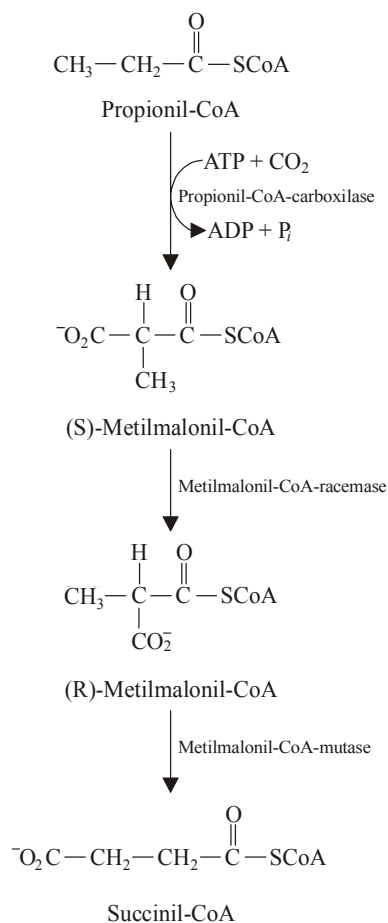
$\downarrow$ Metilmalonil-CoA-racemase

$CH_3-CH(CO_2^-)-C(=O)-SCoA$

(R)-Metilmalonil-CoA

$\downarrow$ Metilmalonil-CoA-mutase

$^{-}O_2C-CH_2-CH_2-C(=O)-SCoA$

Succinil-CoA

G. Vias secundárias de oxidação dos ácidos graxos

Nos microssomas de alguns tecidos, os ácidos graxos de cadeia ramificada (ácidos fitâmicos) sofrem α–*oxidação,* na qual somente um átomo de carbono é removido por vez a partir do terminal carboxílico em processo que envolve o NAD^+ e o ascorbato. A doença de Refsum é um distúrbio neurológico raro, caracterizado pelo acúmulo de ácido fitâmico nos tecidos nervosos como resultado de um defeito genético na α-oxidação.

Na ω–*oxidação,* o terminal ω (o átomo de carbono mais distante do grupo carboxila) é oxidado a hidroxiácido graxo para formar um ácido graxo com duas carboxilas em reação catalisada por *oxidases de função mista* que requerem citocromo P_{450}, o O_2 e o NADPH como doador de elétrons. As reações ocorrem no retículo endoplasmático do fígado e do rim. O ácido dicarboxílico formado entra na mitocôndria e é degradado por β–oxidação nas duas extremidades da molécula. Sob condições normais, relativamente pouco ácido graxo é oxidado nessa via.

10.4 Corpos cetônicos

Sob condições normais, a acetil-CoA proveniente da β–oxidação é utilizada quase em sua totalidade pelo ciclo do ácido cítrico e para a síntese de isoprenóides. O metabolismo dos ácidos graxos é regulado de tal forma que somente pequenas quantidades de acetil–CoA são produzidas em excesso. Em certas condições metabólicas, tais como, jejum prolongado, inanição e diabete melito, ocorre aumento na velocidade da β–oxidação, tornando necessário reciclar o excesso de acetil–CoA e liberar a CoA livre para novas β–oxidações. No fígado, o grupo acetil da acetil–CoA é transformado em *corpos cetônicos* em processo chamado *cetogênese*. Os corpos cetônicos consistem de *acetoacetato,* β–*hidroxibutirato* e *acetona* e são utilizados como combustível hidrossolúvel pelos tecidos extra–hepáticos.

A cetogênese ocorre em três reações:

1. Formação de acetoacetil–CoA. A primeira reação na formação do acetoacetato (fonte primária de todos os corpos cetônicos) é a condensação de duas moléculas de acetil–CoA para gerar acetoacetil–CoA, catalisada pela *acetil–CoA–acetiltransferase.* A formação da ligação C–C é favorecida energeticamente pela ruptura do enlace tioéster.

2. Formação de HMG–CoA. A acetoacetil–CoA é convertida a 3–hidroxi–3–metilglutaril–CoA (HMG–CoA) por condensação com uma terceira molécula de acetil–CoA pela ação da *hidroxi-metilglutaril–CoA–sintase.* A HMG–CoA é também um precursor da biossíntese do colesterol.

3. Formação de acetoacetato e acetil–CoA. A clivagem da HMG–CoA fornece o acetoacetato livre pela *hidroxi–metilglutaril–CoA–liase.*

Parte do acetoacetato é reduzido a β–hidroxibutirato por uma β–*hidroxibutirato–desidrogenase* NAD^+*–dependente* ligada à membrana mitocondrial interna. Essa enzima é específica para o D–isômero em contraste com o L–isômero acoplado a CoA intermediária da β–oxidação.

Certa quantidade de acetoacetato sofre contínua descarboxilação não-enzimática espontânea à acetona. Em condições normais a formação de acetona é negligenciável, no entanto, em acúmulos patológicos de acetoacetato, a quantidade de acetona no sangue pode ser detectada no ar expirado pelo paciente.

A presença aumentada de corpos cetônicos no sangue e na urina acompanhado de odor de acetona no ar expirado, é denominada *cetose.* Essa condição ocorre quando a velocidade de produção de corpos cetônicos pelo fígado excede a capacidade de sua utilização pelos tecidos periféricos, resultando em acúmulo no sangue (*cetonemia*). Ao ultrapassar o limiar renal, essas substâncias aparecem na urina (*cetonúria*).

$2\ CH_3-C(=O)-S-CoA$ Acetil—CoA

Acetil-CoA acetil-transferase → CoA

$CH_3-C(=O)-CH_2-C(=O)-S-CoA$ Acetoacetil—CoA

HMG-CoA-sintase (Acetil—CoA → CoA)

$^{-}OOC-CH_2-C(OH)(CH_3)-CH_2-C(=O)-S-CoA$ HMG—CoA

HMG-CoA-liase → Acetil—CoA

$^{-}OOC-CH_2-C(=O)-CH_3$ Acetoacetato

NADH + H^+ → NAD^+ β-Hidroxibutirato desidrogenase

→ CO_2

$^{-}OOC-CH_2-CH(OH)-CH_2$ β-Hidroxibutirato

$CH_3-C(=O)-CH_3$ Acetona

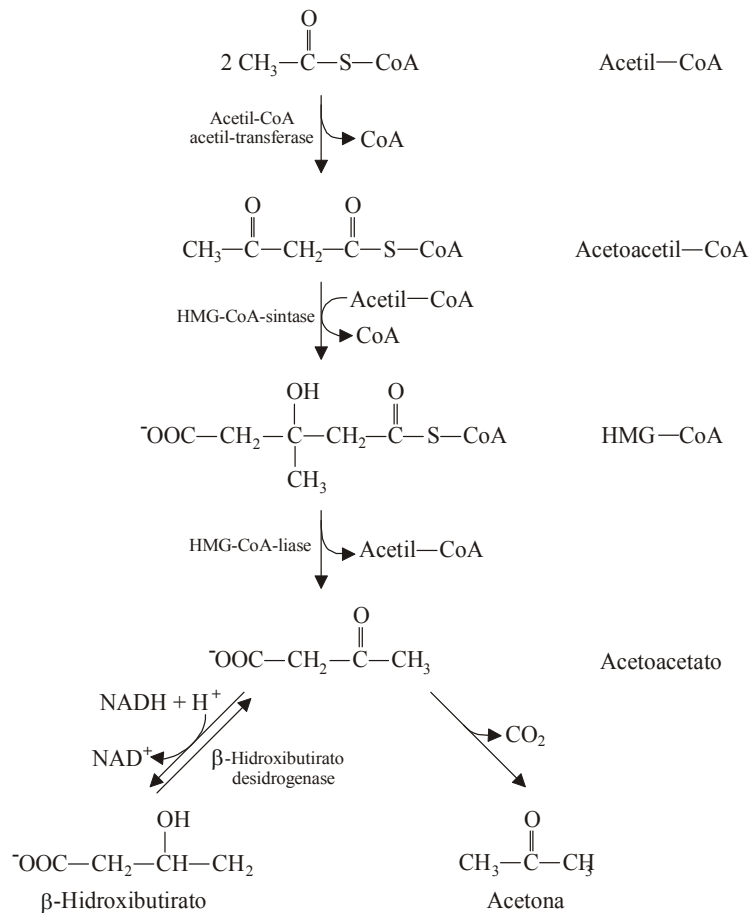



Figura 10.5
Síntese de corpos cetônicos nas mitocôndrias hepáticas. Em circunstâncias normais, somente pequenas quantidades de corpos cetônicos são produzidas. No jejum prolongado, inanição e diabetes melito ocorre a formação excessiva de corpos cetônicos.

Em jejum prolongado e diabete melito (estado com insulina baixa e glucagon elevado), como conseqüência do direcionamento do oxaloacetato para a formação de glicose (gliconeogênese), ocorre limitação da operação do ciclo do ácido cítrico. Desse modo, a grande quantidade de acetil–CoA produzida pela β–oxidação dos ácidos graxos no fígado é canalizada para a síntese de corpos cetônicos. Quando a formação de corpos cetônicos atinge níveis acima da capacidade compensatória dos sistemas tampões fisiológicos, desenvolve-se *cetoacidose.*

Vários tecidos, mais notadamente o músculo cardíaco e esquelético, empregam corpos cetônicos para gerar energia. O cérebro aumenta consideravelmente a utilização de corpos cetônicos como fonte de energia durante o período de jejum prolongado e inanição, economizando a glicose e reduzindo a degradação da proteína muscular para a gliconeogênese.

Nos tecidos periféricos, o β–hidroxibutirato é oxidado a acetoacetato, que é então ativado pela ação de uma *tioforase* que emprega a succinil–CoA como fonte de CoA, formando

acetoacetil−CoA. Esta última sofre clivagem pela *tiolase,* produzindo duas moléculas de acetil−CoA que entram no ciclo do ácido cítrico.

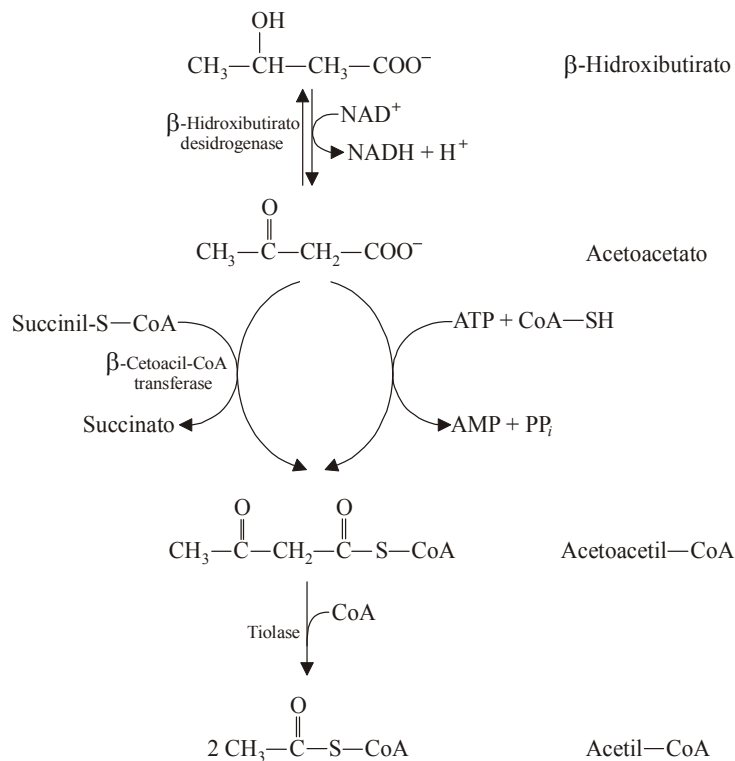



Figura 10.6
Catabolismo dos corpos cetônicos. Os corpos cetônicos são transformados em acetil−CoA em alguns órgãos, como por exemplo, músculo cardíaco e esquelético.

10.5 Biossíntese de ácidos graxos

A maioria dos ácidos graxos utilizados pelos mamíferos é suprida pela dieta. Todavia, também podem sintetizar quase todos os ácidos graxos saturados e insaturados necessários para os processos metabólicos vitais. Não produzem, entretanto, alguns ácidos graxos insaturados, tais como, o *linolênico* e *linoléico,* que são supridos pela dieta, sendo denominados *ácidos graxos essenciais.* Esses ácidos graxos são abundantes em peixes e óleos vegetais. A deficiência de ácidos graxos essenciais resultante de dieta com baixo conteúdo em gorduras apresenta sintomas como o crescimento lento e demora na cura de ferimentos.

Os ácidos graxos são formados a partir de acetil−CoA proveniente, quase totalmente, da glicose da dieta, ingerida além das necessidades imediatas de energia e da capacidade de armazenar glicogênio. A síntese ocorre principalmente no tecido adiposo, no fígado e nas glândulas mamárias de animais em lactação.

Inicialmente é formado o ácido palmítico (cadeia linear saturada com 16 átomos de carbono), a partir do qual outros ácidos graxos são derivados.

A. Transporte de acetato mitocondrial para o citosol

A biossíntese dos ácidos graxos é um processo que ocorre exclusivamente no citosol. Contudo, a acetil–CoA gerada nas mitocôndrias não se difunde espontaneamente para o citosol; em lugar disso, atravessa a membrana mitocondrial interna sob a forma de *citrato*, produzido a partir da condensação do oxaloacetato e acetil–CoA no ciclo do ácido cítrico. Em concentrações elevadas, o ATP inibe a enzima isocitrato–desidrogenase no ciclo do ácido cítrico, provocando o acúmulo de citrato na mitocôndria; o excesso difunde-se livremente para o citosol pela membrana mitocondrial interna por meio do *carreador do tricarboxilato.* No citosol, a acetil–CoA é regenerada, a partir do citrato pela ação da enzima *ATP–citrato–liase:*

$$\begin{array}{c} H_2C-COOH \\ | \\ HO-C-COOH \\ | \\ H_2C-COOH \end{array} + HS-CoA \xrightarrow[\text{ATP-citrato-liase}]{ATP \quad ADP + P_i} H_3C-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-S-CoA + \begin{array}{c} O \\ \| \\ C-COOH \\ | \\ H_2C-COOH \end{array}$$

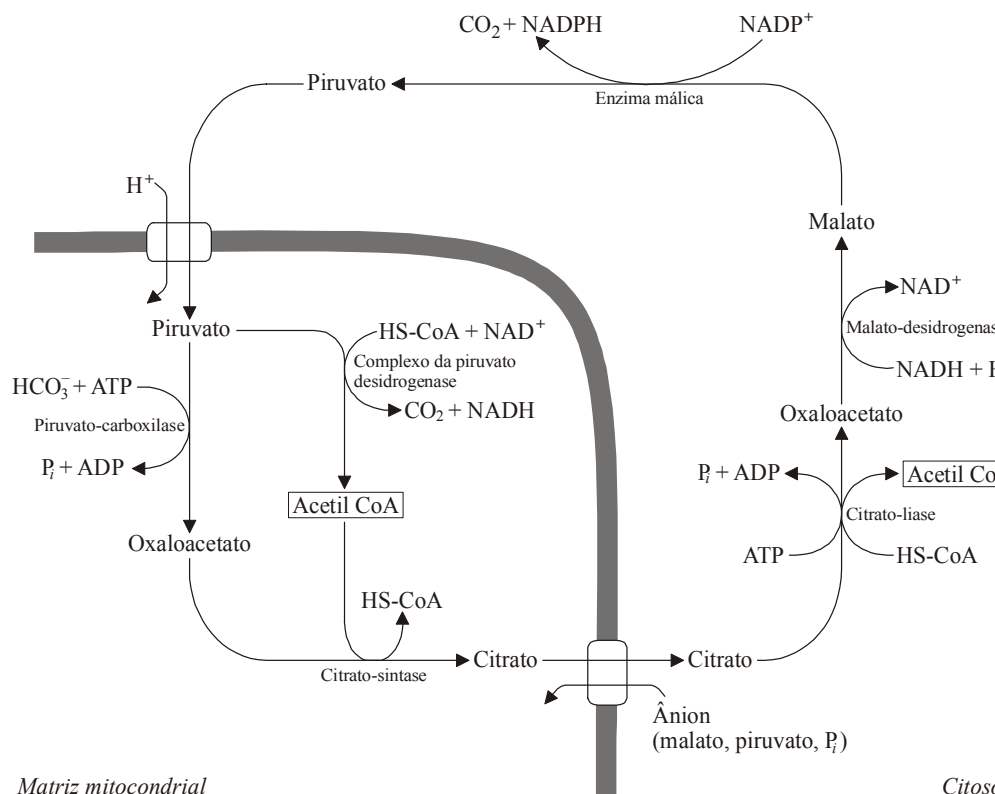
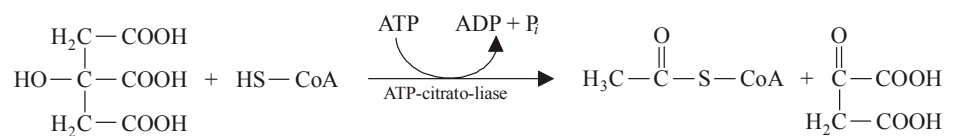
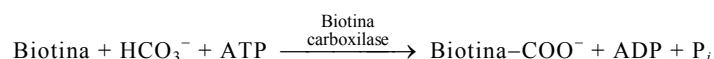



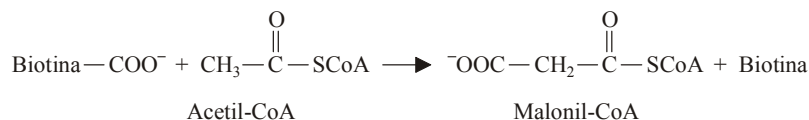
Figura 10.7
Mecanismo de transporte da acetil–CoA da mitocôndria para o citosol.

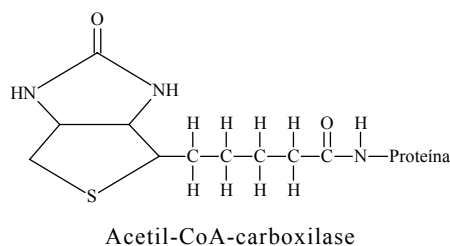
Este processo também transfere o oxaloacetato da mitocôndria para o citosol.

B. Síntese dos ácidos graxos saturados, o ácido palmítico

O ácido palmítico é sintetizado a partir de uma molécula de acetil–CoA e sete moléculas de *malonil–CoA.* Esta última é produzida pela carboxilação do acetil–CoA. Inicialmente, o CO_2 (como bicarbonato, HCO_3^-) é "ativado" por ligação covalente à biotina com a conversão do ATP em ADP + P_i em reação catalisada pela *biotina–carboxilase* (*ver* adiante):

$$\text{Biotina} + HCO_3^- + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Biotina carboxilase}} \text{Biotina–COO}^- + \text{ADP} + P_i$$

A seguir, o grupo prostético carboxibiotina transfere o grupo carboxilato para o acetil–CoA para formar um composto de três carbonos, a malonil–CoA e regenerar a enzima.

$$\text{Biotina—COO}^- + \underset{\text{Acetil-CoA}}{CH_3\text{—}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{—SCoA}} \longrightarrow \underset{\text{Malonil-CoA}}{{}^-OOC\text{—}CH_2\text{—}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{—SCoA}} + \text{Biotina}$$

A reação total, catalisada pela *acetil–CoA–carboxilase* uma enzima composta de três enzimas (proteína transportadora de biotina, biotina–carboxilase e a transcarboxilase) em um único polipeptídeo multifuncional que requer biotina e Mn^{2+}, é a etapa limitante de velocidade na síntese de ácidos graxos nos mamíferos. A acetil–CoA–carboxilase é uma enzima alostérica ativada pelo citrato e isocitrato e inibida por acil–CoA de cadeia longa, como o palmitoil–CoA. A biotina está ligada a um resíduo de lisina da enzima.

Acetil-CoA-carboxilase

A malonil–CoA é o doador das unidades acetil de dois carbonos para a construção de ácidos graxos.

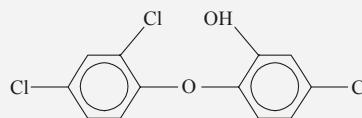
C. Reações do complexo ácido graxo sintase

A produção de ácidos graxos de cadeia longa (ácido palmítico) a partir da malonil–CoA envolve o sistema multienzimático denominado *complexo ácido graxo sintase,* constituído por seis enzimas que catalisam etapas sucessivas da síntese. As proteínas enzimáticas do complexo estão unidas entre si, operando a seqüência de forma eficiente e regulada. Portanto, apesar de cada reação ser examinada separadamente, elas estão intimamente integradas.

Na biossíntese dos ácidos graxos é necessário que todos os intermediários acílicos participantes do processo liguem-se como tioésteres, à *proteína transportadora de acila (ACP, acil carrier protein)* cujo grupo prostético, a 4′–fosfopanteteína, também está presente na estrutura da coenzima A.

Quadro 10.1 Triclosan

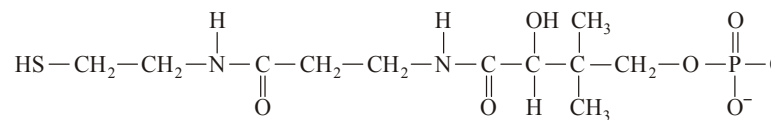
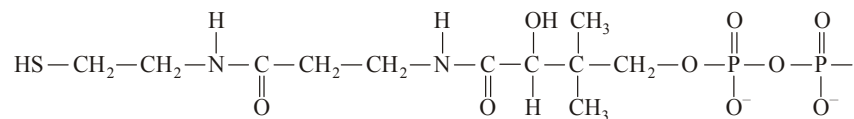
Muitos cosméticos, dentifrícios, desodorantes, sabões antisépticos, brinquedos para bebes, alguns tapetes e utensílios domésticos contém o composto 5-cloro-2-(2,4-diclorofenóxi)fenol, mais conhecido com triclosan:

Cl OH
Cl O Cl

Esse composto é usado a mais de 30 anos como agente antibacteriano. O triclosan atua como um antibiótico com alvo bioquímico específico: uma das enzimas da síntese dos ácidos graxos (nas bactérias, as enzimas de síntese são proteínas separadas e não parte de um complexo multienzimático).

O triclosan inibe a enoil-ACP
texto). A síntese dos ácidos grax
sobrevivência das bactérias. No sí
dos anéis fenil do triclosan, c
intermediário da reação, permane
cofator NADPH. O triclosan també
de van der Waals e pontes de h
aminoácidos no sítio ativo. Alguma
resistentes ao triclosan apresentar
desses contatos.
A ação específica do triclosa
enzima da síntese de ácidos gra
variedades de bactérias resistentes
está sujeito aos mesmos inco
antibióticos – a resistência por mei
ampla utilização do triclosan aum
resistência gênica e, portanto, o se
antimicrobiano.

$$HS-CH_2-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-CH_2-NH-C(=O)-CH(OH)-C(CH_3)_2-CH_2-O-P(=O)(O^-)-$$

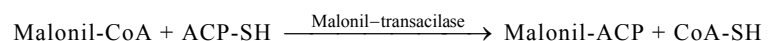
Proteína transportadora de acila (ACP)

$$HS-CH_2-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-CH_2-NH-C(=O)-CH(OH)-C(CH_3)_2-CH_2-O-P(=O)(O^-)-O-P(=O)(O^-)-$$

Coenzima A

As etapas catalisadas pelas seis enzimas do complexo ácido graxo sintase que convertem a acetil-CoA e a malonil–CoA em ácido palmítico são descritas a seguir.

1. Condensação da acetil e malonil. Inicialmente, o grupo acetil da acetil–CoA é transferido para a enzima 3-cetoacil-ACP-sintase em reação catalisada por uma das seis enzimas do complexo, a *acetil–CoA–transacilase.*

A seguir, o grupo malonil da malonil-CoA é transferido para o grupo –SH da ACP pela ação da *malonil–transacilase.*

$$\text{Malonil-CoA} + \text{ACP-SH} \xrightarrow{\text{Malonil–transacilase}} \text{Malonil-ACP} + \text{CoA-SH}$$

O grupo malonil da malonil–ACP condensa com o grupo acetil ligado à enzima *3–cetoacil–ACP–sintase* (por meio da Cys) para formar acetoacetil–ACP em reação irreversível.

$$ACP{-}S{-}C(=O){-}CH_2{-}COO^- + Enzima{-}S{-}C(=O){-}CH_3 \xrightarrow[\text{ACP-sintase}]{\text{3-Cetoacil-}} ACP{-}S{-}C(=O){-}CH_2{-}C(=O){-}CH_3 + Enzima{-}SH + CO_2$$

Malonil-ACP Acetil-Enzima Acetoacetil-ACP

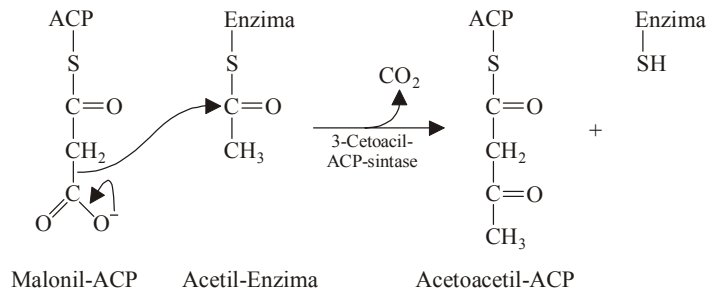
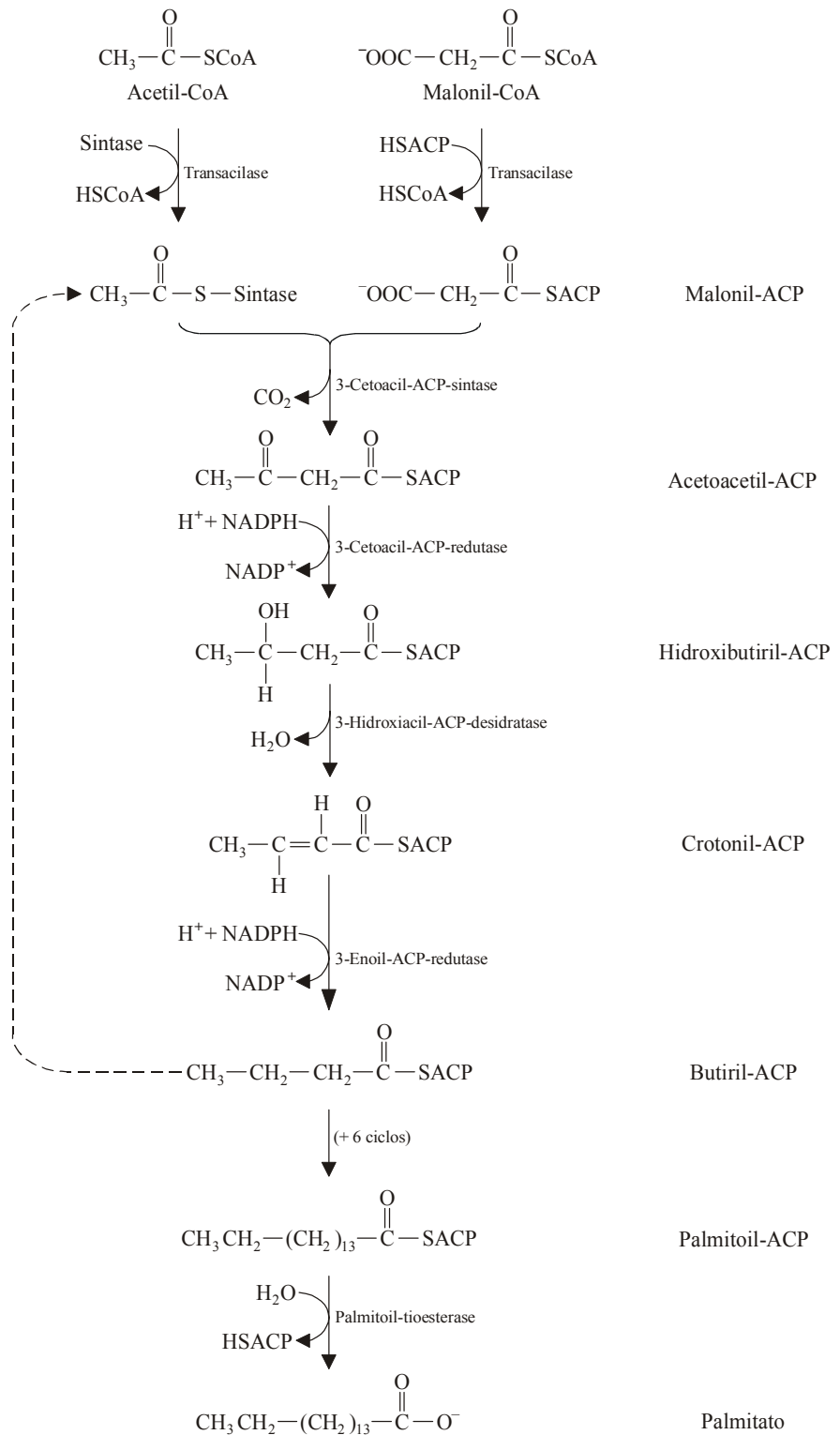



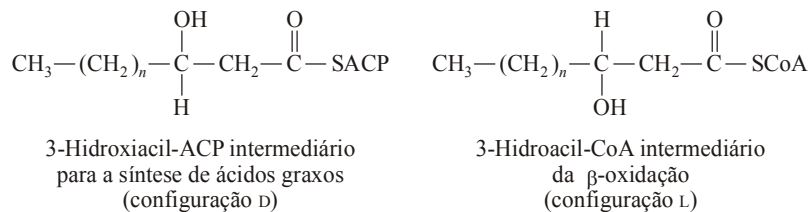
Figura 10.8
Operação do complexo ácido graxo sintase. Biossíntese de butiril-ACP a partir de acetil–ACP e malonil–ACP.

No processo, o grupo carboxílico livre de malonil é liberado como CO_2. Desta forma, o dióxido de carbono adicionado durante a síntese da malonil−CoA não é incorporado à cadeia carbonada do ácido graxo.

2. Redução do grupo carbonila. A fase seguinte envolve a redução do grupo carbonila em C3 da acetoacetil−ACP pelo NADPH e em presença da *3−cetoacil−ACP−redutase,* com a formação de D−β−hidroxibutiril−ACP. O intermediário 3−hidroxil envolvido na biossíntese apresenta configuração D, em lugar da configuração L, encontrada na β−oxidação.

$$CH_3-(CH_2)_n-\underset{H}{\overset{OH}{C}}-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-SACP \qquad CH_3-(CH_2)_n-\underset{OH}{\overset{H}{C}}-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-SCoA$$

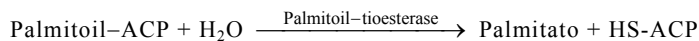
3-Hidroxiacil-ACP intermediário para a síntese de ácidos graxos (configuração D)

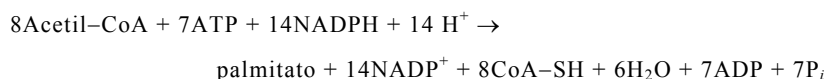
3-Hidroacil-CoA intermediário da β-oxidação (configuração L)

3. Desidratação. A D−3−hidroxibutiril−ACP é convertida a crotonil−ACP por desidratação pela ação da *3−hidroxiacil−ACP−desidratase.* O produto tem configuração *trans* na ligação dupla.

4. Redução da dupla ligação. A enzima *3−enoil−ACP−redutase* catalisa a redução da dupla ligação da crotonil−ACP pelo NADPH para fornecer butiril−ACP.

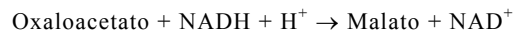
Com a produção de butiril−ACP está completo o primeiro dos sete ciclos para a formação de palmitoil−ACP. Para formar o palmitato o ciclo é repetido mais seis vezes. O ciclo seguinte é iniciado pela transferência do grupo butiril do ACP para o grupo −SH da 3−acetoacil−ACP−sintase (originalmente ocupado pelo grupo acetil), permitindo à ACP receber o malonil de outra molécula de malonil−CoA.

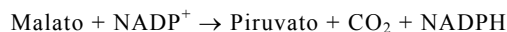
São necessários sete ciclos completos para produzir palmitoil−ACP posteriormente transformado em palmitato e HS−ACP pela ação da *palmitoil−tioesterase*.

$$\text{Palmitoil−ACP} + H_2O \xrightarrow{\text{Palmitoil−tioesterase}} \text{Palmitato} + \text{HS-ACP}$$

A estequiometria global para a síntese do palmitato a partir do acetil−CoA é:

$$8\text{Acetil−CoA} + 7\text{ATP} + 14\text{NADPH} + 14\ H^+ \rightarrow$$
$$\text{palmitato} + 14\text{NADP}^+ + 8\text{CoA−SH} + 6H_2O + 7\text{ADP} + 7P_i$$

A biossíntese do palmitato requer, portanto, acetil−CoA, ATP e NADPH. Os NADPH nos adipócitos e hepatócitos são provenientes principalmente da via das pentoses-fosfato (*ver* Capítulo 6: Metabolismo dos carboidratos) e, em menor grau, pela *enzima málica*.

A formação de NADPH pela enzima málica ocorre em duas etapas: inicialmente o oxaloacetato é reduzido a malato pelo NADH em reação catalisada pela *malato−desidrogenase:*

$$\text{Oxaloacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Malato} + \text{NAD}^+$$

A *enzima málica* catalisa a descarboxilação oxidativa do malato com a produção de NADPH:

$$\text{Malato} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{Piruvato} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$$

O piruvato citosólico entra na mitocôndria e é convertido a oxaloacetato pela piruvato−carboxilase ou em acetil−CoA pela piruvato−desidrogenase.

Para a síntese do palmitato, oito NADPH são gerados pela transferência de oito oxaloacetatos de volta à mitocôndria (pois foram oito acetil−CoA transferidos no caminho inverso).

D. Alongamento e dessaturação dos ácidos graxos

O alongamento e a dessaturação (formação de duplas ligações) dos ácidos graxos biossintetizados ou obtidos da dieta é realizado fundamentalmente por enzimas do sistema reticuloendotelial. (O processo ocorre somente quando a dieta não contém a quantidade apropriada de ácidos graxos). A alongamento e dessaturação são especialmente importantes na regulação da fluidez das membranas e para a síntese de vários precursores derivados dos ácidos graxos, como os eicosanóides. Por exemplo, a mielinização (um processo no qual a bainha da mielina é formada ao redor de certos nervos) depende especialmente das reações de síntese de ácidos graxos no sistema retículo endoplasmático. Ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia muito longa são constituintes importantes dos cerebrosídeos e sulfatídeos encontrados na mielina. Aparentemente as células regulam a fluidez das membranas ajustando os tipos de ácidos graxos que são incorporados na membrana biológica. Por exemplo, em climas frios, mais ácidos graxos insaturados são incorporados (os ácidos graxos insaturados têm pontos de congelamento mais baixos que os saturados). Se a dieta não supre a quantidade suficiente dessas moléculas, as vias de síntese dos ácidos graxos são ativadas.

O palmitato (ácido graxo saturado de C_{16}) formado nas reações catalisadas pelo complexo ácido graxo sintase, é o precursor de outros ácidos graxos de cadeia longa saturados e insaturados. Dois mecanismos diferentes estão disponíveis para o alongamento: um na mitocôndria e outro no retículo endoplasmático liso. Nos dois sistemas a palmitoil−ACP é convertida a palmitoil−CoA.

Na mitocôndria, o alongamento ocorre pela adição e pela redução sucessivas de unidades acetil em um processo inverso à oxidação de ácidos graxos. O alongamento do acil−CoA no retículo endoplasmático envolve condensações sucessivas de acetil doados pela malonil−CoA. A síntese no retículo endoplasmático fornece ácidos graxos de cadeia longa (C18 a C24) necessários para o desenvolvimento do sistema nervoso central na mielinização das células nervosas.

Os mamíferos superiores são capazes de introduzir duplas ligações na configuração *cis* nos ácidos graxos saturados em presença de NADH e O_2 catalisadas por *acil−CoA graxo−dessaturase* (oxidase de função mista). As reações ocorrem no retículo endoplasmático hepático e necessitam *citocromo* b_5, *NADH−citocromo−*b_5*−redutase* (uma flavoproteína) e uma *dessaturase,* firmemente ligados à membrana. Tanto o NADH como o ácido graxo são oxidados e dois

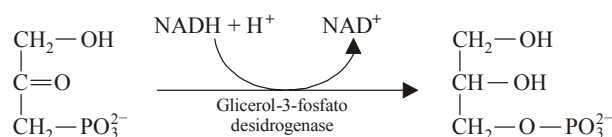
pares de elétrons são transferidos para o O_2 com a formação de H_2O. Essas reações são parte da denominada cadeia microssomial de elétrons.

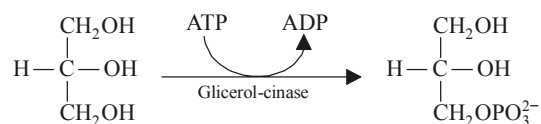
As dessaturações mais freqüentes utilizam acil-CoA saturadas como substratos com a introdução de dupla ligação no C9 a partir do terminal carboxílico. A *estearoil–CoA–dessaturase* catalisa a transformação do estearil–CoA em oleil–CoA. Por mecanismo semelhante, a palmitoleoil–CoA é produzida a partir da palmitoil–CoA. A atividade desta enzima e sua síntese são controladas tanto pela dieta como por mecanismos hormonais.

F. Síntese de triacilgliceróis

Os triacilgliceróis são sintetizados pela adição de acil-CoA graxo (biossintetizados ou supridos pela dieta) ao glicerol–3–fosfato ou à diidroxiacetona–fosfato. A síntese ocorre principalmente no fígado, intestino e tecido adiposo. O glicerol–3–fosfato é formado por duas vias: (1) a partir da diidroxiacetona–fosfato gerada na glicólise (*ver* Capítulo 6: Metabolismo dos carboidratos) ou (2) formado a partir do glicerol pela ação da glicerol–cinase.

A diidroxiacetona–fosfato é transformada em glicerol–3–fosfato em reação catalisada pela *glicerol–3–fosfato–desidrogenase:*

$$\begin{array}{c} CH_2-OH \\ | \\ C=O \\ | \\ CH_2-PO_3^{2-} \end{array} \xrightarrow[\text{Glicerol-3-fosfato desidrogenase}]{NADH + H^+ \quad NAD^+} \begin{array}{c} CH_2-OH \\ | \\ CH-OH \\ | \\ CH_2-O-PO_3^{2-} \end{array}$$

No fígado, rim e intestino delgado ocorre a fosforilação do glicerol livre em presença de *glicerol–cinase:*

$$\begin{array}{c} CH_2OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{array} \xrightarrow[\text{Glicerol-cinase}]{ATP \quad ADP} \begin{array}{c} CH_2OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OPO_3^{2-} \end{array}$$

Os adipócitos são desprovidos de glicerol–cinase e obtém o glicerol–3–fosfato exclusivamente pela reação da glicerol–3–fosfato–desidrogenase. O glicerol livre obtido na hidrólise dos triacilgliceróis nos adipócitos não é utilizado no próprio tecido e sim, é levado ao fígado onde é transformado em glicerol–3–fosfato pela glicerol–cinase.

Os acil–CoA empregados na síntese dos triacilgliceróis são provenientes de ácidos graxos livres ativados pela ação das *acil–CoA–sintetases* (*ver* seção 10.4A):

$$\text{Ácido graxo} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightarrow \text{acil–CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

Glicerol-3-fosfato

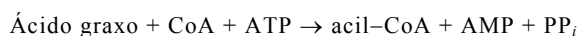
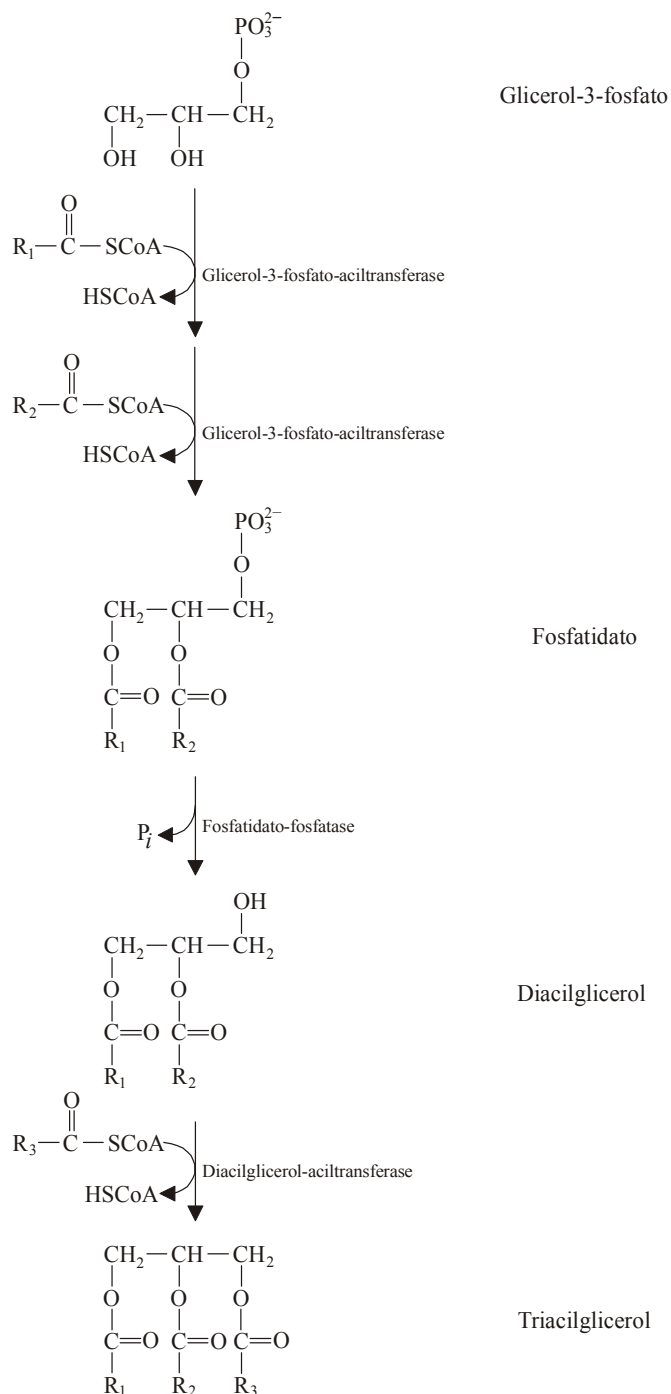
$R_1-C(=O)-SCoA$ → $HSCoA$ (Glicerol-3-fosfato-aciltransferase)

$R_2-C(=O)-SCoA$ → $HSCoA$ (Glicerol-3-fosfato-aciltransferase)

Fosfatidato

P_i (Fosfatidato-fosfatase)

Diacilglicerol

$R_3-C(=O)-SCoA$ → $HSCoA$ (Diacilglicerol-aciltransferase)

Triacilglicerol

A primeira etapa na biossíntese dos triacilgliceróis é a acilação dos dois grupos hidroxila livres do glicerol−3−fosfato por duas moléculas de acil−CoA graxo para formar *diacilglicerol−3−fosfato* (fosfatidato ou ácido fosfatídico) em presença da *glicerol−3−fosfato−aciltransferase.*

A enzima *fosfatidato−fosfatase* converte o diacilglicerol−3−fosfato (fosfatidato) em 1,2−diacilglicerol.

O fosfatidato e o 1,2–diacilglicerol são precursores de triacilgliceróis e de glicerofosfolipídeos.

Na etapa final da biossíntese de triacilgliceróis ocorre a acilação da posição sn–3 do 1,2–diacilglicerol por meio da *diacilglicerol–aciltransferase*.

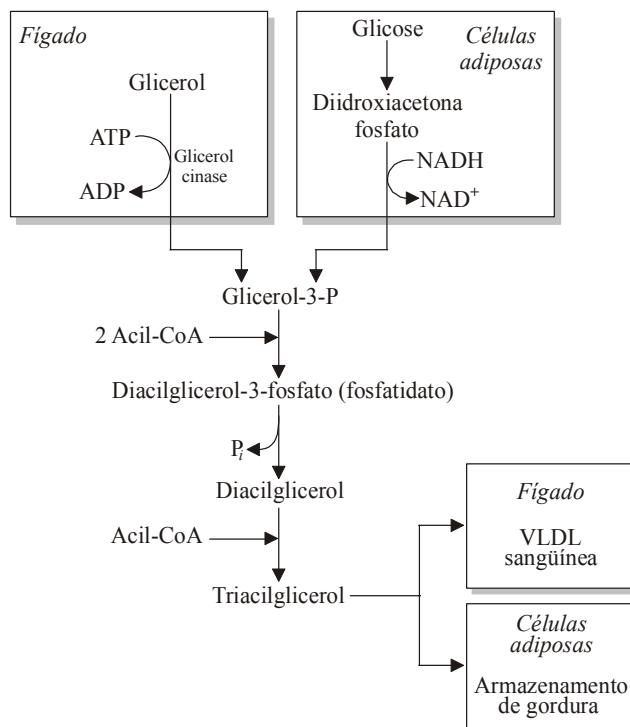



Figura 10.9

Visão geral da biossíntese dos triacilgliceróis. O glicerol–3–fosfato é proveniente do glicerol no fígado e da diidroxiacetona–fosfato no tecido adiposo.

G. Regulação do metabolismo dos ácidos graxos

Mecanismos de curta e longa duração estão envolvidos na regulação do metabolismo dos ácidos graxos. Na regulação de curta duração (medida em minutos) a atividade de muitas enzimas-chave são modificadas por hormônios. Por exemplo, o glucagon e a adrenalina (liberados quando as reservas energéticas estão baixas ou quando há um aumento de consumo) estimulam a fosforilação de várias enzimas. A fosforilação da lipase hormônio-sensível presente nos adipócitos, ativa a hidrólise de triacilglicerol. (A liberação de noradrenalina dos neurônios no sistema nervoso simpático e do hormônio do crescimento da hipófise também ativa a lipase hormônio–sensível). Subseqüentemente, os ácidos graxos são liberados para o sangue. Os hormônios também regulam a utilização dos ácidos graxos pelos tecidos. Por exemplo, a acetil–CoA–carboxilase é inibida pelo glucagon. Em baixas concentrações de malonil–CoA, a síntese de ácidos graxos é reduzida. Como a malonil–CoA inibe a atividade da carnitina–acil–transferase

I, os ácidos graxos podem ser transportados para a mitocôndria, onde são degradados para gerar energia.

O efeito da insulina sobre o metabolismo dos ácidos graxos é oposta aos dos hormônios glucagon e adrenalina. A secreção de insulina em resposta a elevados níveis de glicose sangüínea estimula a lipogênese. A insulina induz a síntese de ácidos graxos pela fosforilação da acetil−CoA−carboxilase por um processo independente do mecanismo da proteína-cinase dependente de AMPc. A lipólise simultânea é evitada pela insulina por inibição da ativação da proteína-cinase mediada por AMPc. O processo provoca a desfosforilação (portanto, a inativação) da lipase hormônio-sensível.

10.6 Metabolismo de lipídeos de membrana

Os lipídeos de membranas celulares são compostos principalmente por fosfolipídeos e esfingolipídeos.

A. Metabolismo dos fosfolipídeos

A biossíntese de fosfolipídeos ocorre primariamente na superfície do retículo endoplasmático liso, apesar de algumas enzimas também estarem presentes no complexo de Golgi. Como cada enzima é uma proteína associada à membrana com seu sítio ativo voltado para o citosol, a biossíntese dos fosfolipídeos ocorre na interface da membrana do retículo plasmático e o citosol. A composição de ácidos graxos dos fosfolipídeos altera discretamente após a sua síntese. (Tipicamente, os ácidos graxos insaturados substituem os ácidos graxos saturados originais incorporados durante a síntese). Parte do remodelamento é executada por certas fosfolipases e acil−transferases. Provavelmente, o processo permite a célula ajustar a fluidez de suas membranas.

As sínteses da *fosfatidiletanolamina* e *fosfatidilcolina* são similares. A síntese da fosfatidiletanolamina inicia no citoplasma quando a etanolamina entra na célula e é então imediatamente fosforilada. Subseqüentemente, a fosfoetanolamina reage com a CTP (trifosfato de citidina) para formar o intermediário ativado CDP−etanolamina. Vários nucleotídeos servem como carreadores de alta energia para moléculas específicas. Os derivados CDP têm importante papel na transferência de grupos cabeça polar na síntese de fosfoglicerídeo. A CDP−etanolamina é convertida a fosfatidiletanolamina quando reage com o diacilglicerol (DAG). A reação é catalisada por uma enzima no retículo endoplasmático.

A biossíntese da fosfatidilcolina é similar aquela da fosfatidiletanolamina. A colina necessária nessa via é obtida da dieta. Entretanto, a fosfatidilcolina é também sintetizada no fígado a partir da fosfatidiletanolamina. A fosfatidiletanolamina é metilada em três etapas pela enzima fosfatidiletanolamina−*N*−metiltransferase para formar o produto trimetilado, a fosfatidilcolina. O doador de metila é a *S*−*Adenosilmetionina* (SAM) (*ver* Seção 11.8.A).

$HO-CH_2-CH_2-NX_3^+$

Etanolamina/Colina

ATP → ADP

$^-O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH_2-NX_3^+$

Fosfoetanolamina/Fosfocolina

CTP → PP_i → 2 P_i

Citidina$-P(=O)(O^-)-O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH_2-NX_3^+$

CTP-Etanolamina/CDP-Colina

Diacilglicerol

CMP

Fosfatidiletanolamina/Fosfatidilcolina

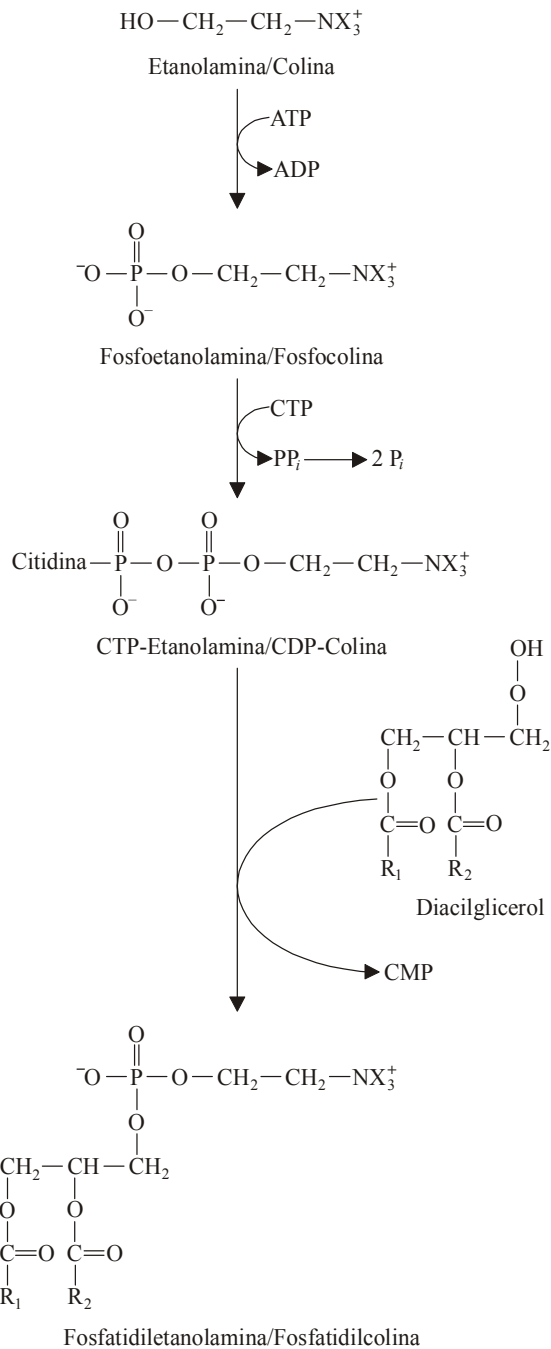



Figura 10.10
Síntese da fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. O X é H na etanolalamina e CH_3 na colina.

A *fofatidilserina* é gerada em reação na qual a etanolamina da fosfatidiletanolamina é substituída pela serina. A reação, catalisada por uma enzima do retículo endoplasmático, é reversível. Na mitocôndria, a fosfatidilserina pode ser convertida em fosfatidiletanolamina por descarboxilação.

$$
\begin{array}{l}
\quad\quad\quad\quad\quad\quad O \\
\quad\quad\quad\quad\quad\quad \| \\
\quad\quad\quad\quad {}^{-}O-P-O-CH_2-CH_2-NH_3^+ \\
\quad\quad\quad\quad\quad\quad | \\
\quad\quad\quad\quad\quad\quad O \\
\quad\quad\quad\quad\quad\quad | \\
CH_2-CH-CH_2 \\
| \quad\quad\quad | \\
O \quad\quad\quad O \\
| \quad\quad\quad | \\
C{=}O \quad C{=}O \\
| \quad\quad\quad | \\
R_1 \quad\quad R_2
\end{array}
$$

Fosfatidiletanolamina

$HO-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$

Serina

$HO-CH_2-CH_2-NH_3^+$

Etanolamina

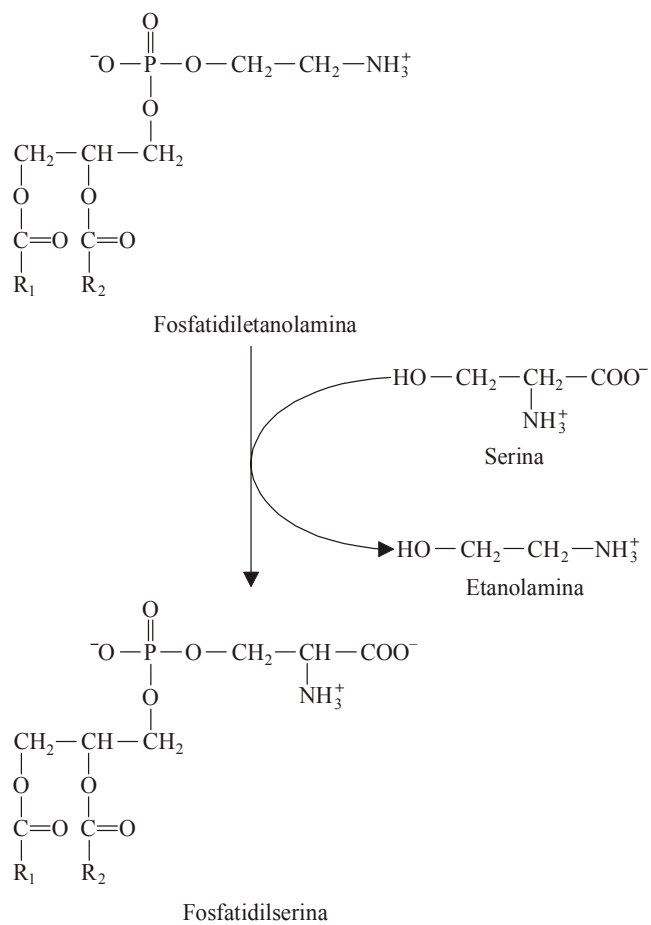
$$
\begin{array}{l}
\quad\quad\quad\quad\quad\quad O \\
\quad\quad\quad\quad\quad\quad \| \\
\quad\quad\quad\quad {}^{-}O-P-O-CH_2-CH-COO^- \\
\quad\quad\quad\quad\quad\quad | \quad\quad\quad\quad\quad\quad | \\
\quad\quad\quad\quad\quad\quad O \quad\quad\quad\quad\quad NH_3^+ \\
\quad\quad\quad\quad\quad\quad | \\
CH_2-CH-CH_2 \\
| \quad\quad\quad | \\
O \quad\quad\quad O \\
| \quad\quad\quad | \\
C{=}O \quad C{=}O \\
| \quad\quad\quad | \\
R_1 \quad\quad R_2
\end{array}
$$

Fosfatidilserina

Figura 10.11
Síntese da fosfatidilserina

O fosfatidilinositol é sintetizado pela condensação de CDP−diacilglicerol com o inositol.

Fosfatidato

CTP

PP_i → $2\ P_i$

CDP-Diacilglicerol

Inositol

CMP

Fosfatidilinositol

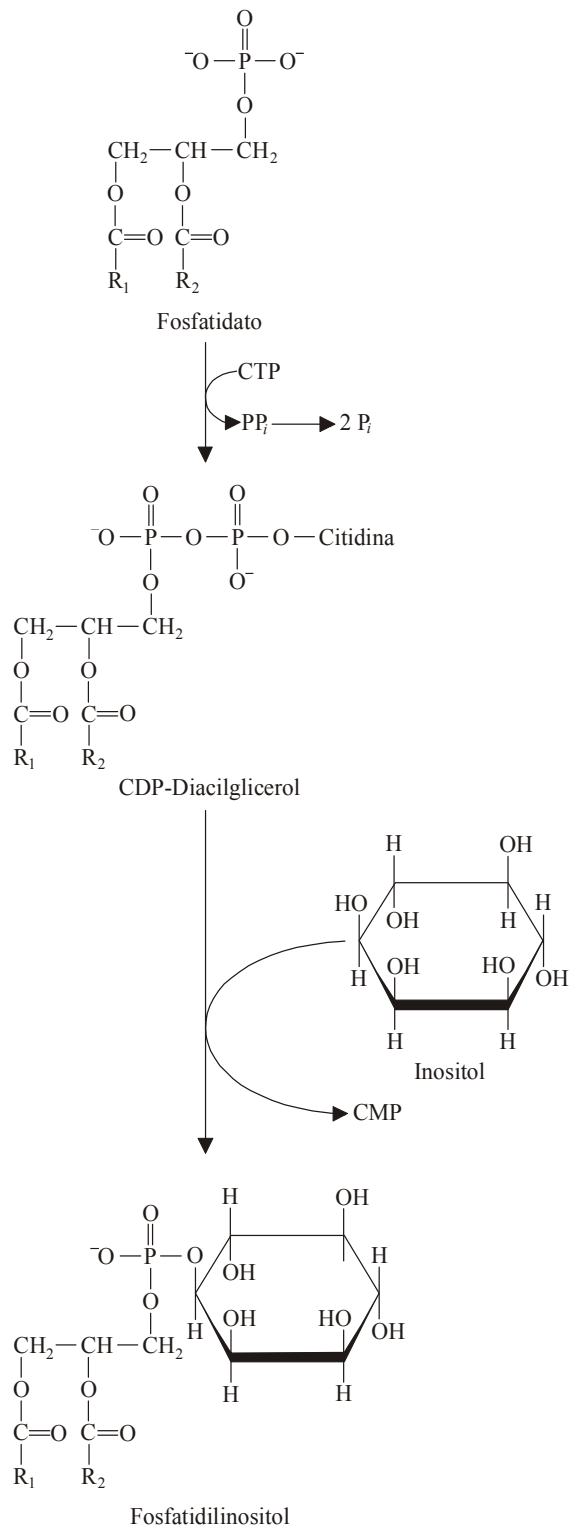



Figura 10.12
Síntese do fosfatidilinositol

O *turnover* dos fosfolipídeos é rápido. Por exemplo, em células animais, cerca de duas divisões celulares são necessárias para a

substituição de metade do número total de moléculas de fosfolipídeos. Os fosfoglicerídeos são degradados pelas fosfolipases. As fosfolipases catalisam o rompimento de ligações específicas em moléculas de fosfoglicerídeos e são denominadas de acordo com a ligação clivada. As fosfolipases A_1 e A_2, que hidrolizam as ligações éster dos fosfoglicerídeos em C1 e C2, respectivamente, contribuem para a remodelação fosfolipídica descrita.

B. Metabolismo dos esfingolipídeos

Os esfingolipídeos em animais possuem ceramida, um derivado do amino–álcool esfingosina. A síntese da ceramina inicia com a condensação de palmitoil–CoA com a serina para formar 3-cetoesfinganina. A reação é catalisada pela 3–cetoesfinganina–sintase, uma enzima piridoxal–5'–fosfato–dependente. A 3–cetoesfinganina é subseqüentemente reduzida pelo NADPH para formar esfinganina. Em processo de duas etapas envolvendo a acil–CoA e $FADH_2$, a esfinganina é convertida a ceramida. A esfingomielina é formada quando a ceramida reage com a fosfatidilcolina. (Em reação alternativa, a CDP–colina é usada em lugar da fosfatidilcolina). Quando a ceramida reage com com a UDP-glicose, a glicosilceramida (um cerebrosídeo comum, às vezes denominado como glicosilcerebrosídeo) é produzida. O galactocerebrosídeo, um precursor de outros glicolipídeos, é sintetizado pela reação da ceramida com a UDP-galactose. Os sulfatídeos são sintetizados quando os galactocerebrosídeos reagem com a molécula doadora de sulfato a *3'–fosfoadenosina–5'–fosfosulfato* (PAPS). A transferência de grupos sulfato é catalisada por uma sulfotransferase microssomal. Os esfingolipídeos são degradados nos lisossomos. As doenças chamadas esfingolipidoses, são provocadas pela falta ou defeito das enzimas necessárias para a degradação dessas moléculas.

10.7 Metabolismo dos isoprenóides

Os isoprenóides ocorrem em todas as células eucarióticas. Apesar da grande diversidade das moléculas isoprenóides, os mecanismos pelas quais diferentes espécies são sintetizadas são similares. De fato, a fase inicial da síntese isoprenóide (síntese do isopentenil pirofosfato) parece ser idêntica em todas as espécies investigadas.

Pela sua importância na biologia humana, o colesterol recebeu enorme atenção dos pesquisadores. Por essa razão, o metabolismo do colesterol é melhor compreendido que qualquer outra molécula de isoprenóide.

A. Biossíntese do colesterol

O colesterol do organismo é derivado de duas fontes: dieta e síntese *de novo*. Quando a dieta fornece colesterol suficiente, a síntese é inibida. A biossíntese do colesterol é estimulada quando a dieta tem pouco colesterol.

Apesar de quase todos os tecidos poderem produzir colesterol (p. ex., glândulas supra–renais, ovários, testículos, pele e intestino), a

maior parte da síntese ocorre no fígado. A síntese do colesterol pode ser dividida em três etapas:

- Síntese de HMG–CoA (β-hidróxi–β–metilglutaril–CoA) a partir de acetil–CoA.
- Conversão do HMG–CoA a esqualeno.
- Conversão do esqualeno em colesterol.

1. Síntese de HMG–CoA a partir do acetato. No citosol duas moléculas de acetil–CoA condensam-se para formar acetoacetil–CoA (também conhecida como β–cetobutiril–CoA) em reação catalisada pela *tiolase*.

Na reação seguinte, o acetoacetil–CoA condensa com uma terceira molécula de acetil–CoA para formar β–hidróxi–β–metilglutaril–CoA (HMG–CoA). A reação é catalisada pela β–hidróxi–β–metilglutaril–CoA–sintase (*HMG–CoA–sintase*). Na mitocôndria, o HMG–CoA é um intermediário para a síntese de corpos cetônicos.

2. Conversão do HMG–CoA a esqualeno. A etapa seguinte da síntese do colesterol inicia com a redução da HMG–CoA para formar mevalonato (um composto de 6C) pela ação da *HMG–CoA–redutase*. O NADPH é o agente redutor.

A HMG–CoA–redutase é a enzima limitante da velocidade de síntese de colesterol. Acúmulo de colesterol na célula proveniente tanto da síntese endógena como da dieta ou degradação, reduz a atividade da HMG–CoA–redutase de dois modos: (a) inibe a atividade da enzima e (b) aumenta a degradação da enzima existente. A atividade e a concentração da HMG–CoA–redutase, localizada na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático, é afetada em vários graus pela concentração de produtos intermediários da via (p. ex.,, mevalonato, farnesil, esqualeno e 7–diidrocolesterol). O mecanismo preciso pelo qual essa importante enzima é regulada, entretanto, permanece obscuro.

$$CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-SCoA + CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-SCoA$$

Acetil-CoA + Acetil-CoA

Tiolase ($\rightarrow$ H—SCoA)

$$CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-SCoA$$

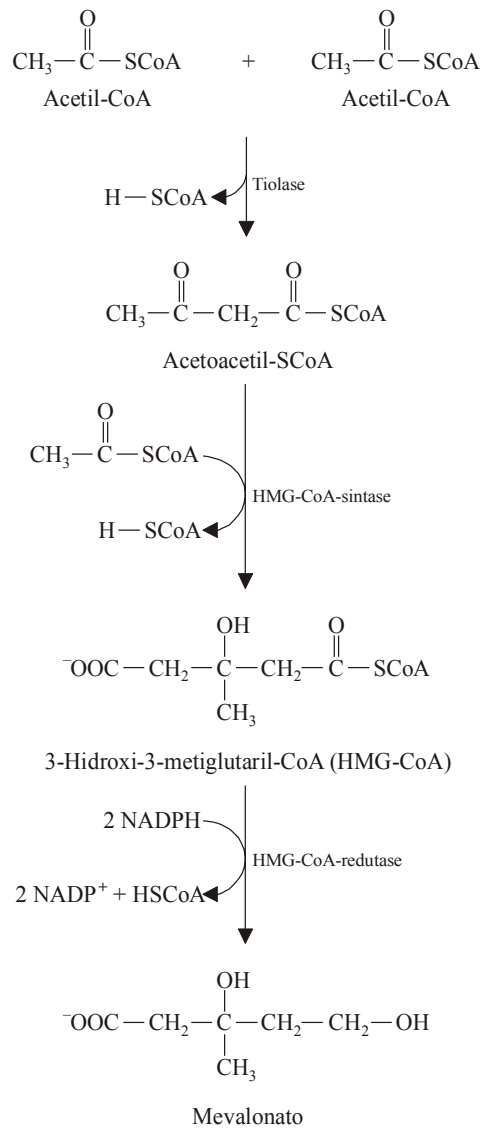
Acetoacetil-SCoA

HMG-CoA-sintase ($CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-SCoA \rightarrow$ H—SCoA)

$$^{-}OOC-CH_2-\underset{CH_3}{\overset{OH}{C}}-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-SCoA$$

3-Hidroxi-3-metiglutaril-CoA (HMG-CoA)

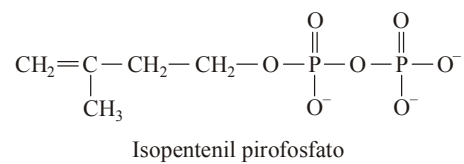
HMG-CoA-redutase (2 NADPH $\rightarrow$ 2 $NADP^+$ + HSCoA)

$$^{-}OOC-CH_2-\underset{CH_3}{\overset{OH}{C}}-CH_2-CH_2-OH$$

Mevalonato

Em uma série de reações citoplasmáticas, o mevalonato é convertido a farnesil−pirofosfato. A mevalonato−cinase catalisa a síntese do fosfomevalonato. Uma segunda reação de fosforilação catalisada pela fosfomevalonato−cinase produz 5−pirofosfomevalonato. A fosforilação aumenta significativamente a solubilidade das moléculas hidrocarbônicas no citoplasma.

O 5−pirofosfomevalonato é transformado em isopentenil pirofosfato em processo envolvendo descarboxilação e desidratação:

$$CH_2=\underset{CH_3}{C}-CH_2-CH_2-O-\underset{O^-}{\overset{O}{\overset{\|}{P}}}-O-\underset{O^-}{\overset{O}{\overset{\|}{P}}}-O^-$$

Isopentenil pirofosfato

O isopentenil–pirofosfato é convertido a seguir em seu isômero dimetilalil–pirofosfato pela isopentenil–pirofosfato isomerase. (Um grupo CH_2=CH–CH_2- sobre uma molécula orgânica é muitas vezes chamadas de *grupo alil*).

O geranil–pirofosfato é produzido durante uma reação de condensação entre isopentenil–pirofosfato e dimetilalil–pirofosfato. O pirofosfato é também um produto da reação e duas reações subseqüentemente. A geranil–transferase catalisa a reação de condensação entre o geranil–pirofosfato e isopentenil–pirofosfato que forma farnesil–pirofosfato. O esqualeno é sintetizado quando a farnesil–transferase (uma enzima microssomal) catalisa a condensação de duas moléculas de farnesil–pirofosfato. A farnesil–transferase as vezes chamada de esqualeno–sintase. Essa reação requer NADPH como um doador de elétrons.

3. Conversão do esqualeno a colesterol. A última fase da via biossintética do colesterol inicia com a ligação do esqualeno a uma proteína transportadora específica chamada proteína transportadora de esterol. A conversão do esqualeno a lanosterol ocorre enquanto os intermediários estão ligados a essa proteína. A *esqualeno–monoxigenase* acrescenta um átomo de oxigênio do O_2 na extremidade da cadeia do esqualeno, produzindo um epóxido e, subseqüentemente, a ciclização (esqualeno–2,3–epóxido–lanosterol–ciclase) que resulta na formação de lanosterol localizada nos microssomos. A esqualeno–monoxigenase requer NADPH e FAD para a sua atividade. Após sua síntese, o lanosterol (que contém os quatro anéis do núcleo esteróide) liga-se a uma segunda proteína transportadora, que permanece ligada durante as reações restantes. As atividades das enzimas que catalisam as restantes 20 reações necessárias para a conversão do lanosterol a colesterol estão embebidas nas membranas microssomiais. Em uma série de transformações envolvendo NADPH e algum oxigênio, o lanosterol é convertido a 7–diidrocolesterol. Esse produto é então reduzido pelo NADPH para formar colesterol.

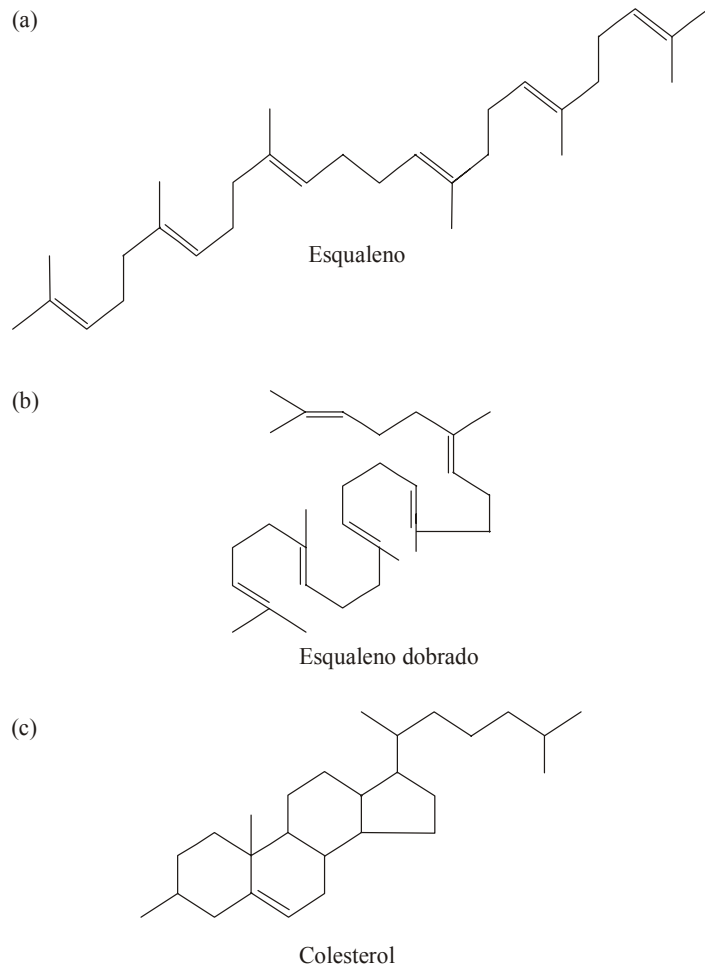



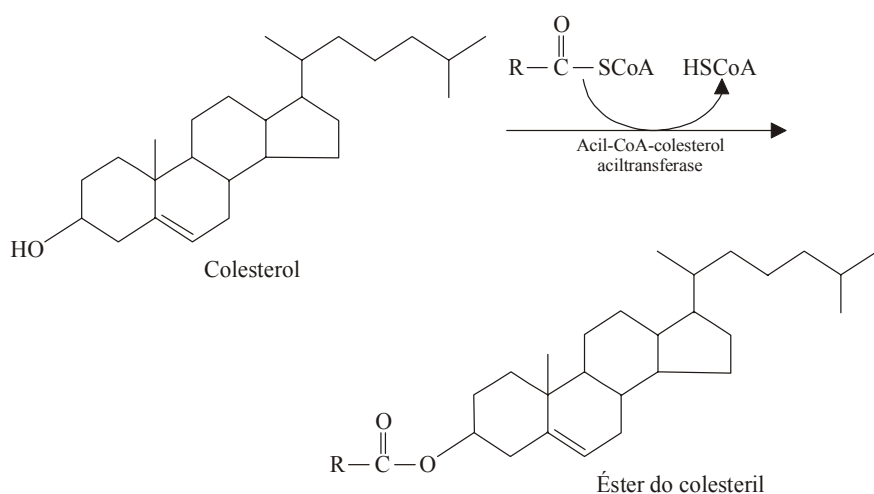
Figura 10.13
Estrutura do esqualeno, um precursor do colesterol. (a) Esqualeno com suas seis unidades isoprênicas, (b) uma molécula de esqualeno dobrado antes da ciclização e (c) colesterol, um derivado do esqualeno com C_{27}.

B. Esterificação do colesterol

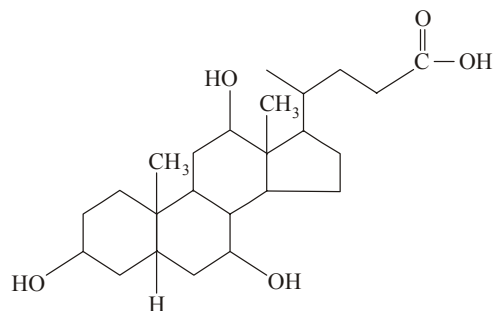
O colesterol livre pode ser esterificado para o armazenamento no fígado ou transportado em partículas VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa) para outros tecidos. Em presença de *acil–CoA:colesterol–aciltransferase* (ACAT) o ácido graxo esterifica o grupo 3–OH do colesterol.

O
R — C — SCoA   HSCoA
Acil-CoA-colesterol aciltransferase

HO
Colesterol

O
R — C — O
Éster do colesteril

C. Transformação do colesterol em ácidos biliares

De modo diferente de outras biomoléculas, o colesterol e outros esteróides não são degradados em moléculas menores. Em lugar disso, o colesterol é convertido em um derivado mais hidrofílico para facilitar sua excreção. O mais importante mecanismo para a degradação e eliminação do colesterol é a síntese dos ácidos biliares.

A conversão do colesterol a 7−α−hidrocolesterol, catalisada pela *colesterol−7−hidroxilase* (uma enzima microssomal que requer oxigênio, NADPH e citocromo P_{450}), é a etapa limitante da velocidade na síntese de sais biliares. Nas últimas reações, a ligação dupla em C5 é rearranjada e reduzida, e um grupo hidroxila adicional é introduzido. Os produtos desse processo, o ácido cólico e ácido desoxicólico, são convertidos a sais biliares por enzimas microssomiais que catalisam reações de conjugação. Nas reações de conjugação a solubilidade de uma molécula é aumentada pela conversão em um derivado que contêm um grupo solúvel em água. Amidas e ésteres são exemplos comuns desses derivados conjugados. A quase totalidade dos ácidos biliares estão conjugados com a glicina ou taurina para formar ácido glicocólico ou ácido taurocólico, respectivamente.

Colato

Os sais biliares são importantes componentes da *bile,* um líquido amarelo-esverdeado produzido pelos hepatócitos que auxiliam na digestão dos lipídeos. Além dos sais biliares, a bile contêm colesterol, fosfolipídeos e pigmentos biliares (bilirrubina e biliverdina) Os pigmentos biliares são produtos de degradação do heme. Após sua secreção para as vias biliares e armazenados na vesícula, a bile é usada no intestino delgado para aumentar a absorção das gorduras da dieta. A bile atua como agente emulsificante que promove a quebra de grandes gotas de gordura em porções menores. Os sais biliares também estão envolvidos na formação de micelas biliares, que ajudam na absorção de gorduras e das vitaminas lipídeo-solúvel (A, D, E, K). A maior parte dos sais biliares é reabsorvida no íleo distal (perto do final do intestino delgado). Eles entram no sangue e retornam ao fígado, onde são re-secretados para os dutos biliares com outros componentes biliares. O significado biológico das reações de conjugação dos ácidos biliares parece ser que o processo de conjugação previne a prematura absorção dos ácidos biliares no trato biliar (dutos biliares e vesícula) e intestino delgado. A reabsorção de sais biliares no íleo distal do intestino delgado é aparentemente desencadeado pelo sinal da glicina ou taurina. Estima-se que as moléculas de sais biliares são recicladas 18 vezes antes de serem finalmente eliminadas.

D. Síntese de hormônios esteróides

Todos os hormônios esteróides são derivados do colesterol. A reação inicial na síntese de hormônios esteróides é a conversão do colesterol em *pregnenolona*, pela *desmolase*, uma enzima mitocondrial complexa composta de duas hidroxilases, uma das quais a enzima citocromo P_{450}. Após a síntese, a pregnenolona é transportada ao retículo endoplasmático, onde é convertida a progesterona. A pregnenolona e progesterona são precursores de todos os hormônios esteróides. Além do papel de precursor, a progesterona também atua como hormônio. O seu papel primário como hormônio é a regulação de várias modificações fisiológicas no útero. Durante o ciclo menstrual, a progesterona é produzida por células especializadas no interior do ovário. Durante a gravidez é produzida em grandes quantidades pela placenta para previr as contrações do músculo uterino liso.

As quantidades e os tipos de esteróides sintetizados em um tecido específico são cuidadosamente regulados. As células respondem a sinais químicos que influenciam o metabolismo dos esteróides por

indução da síntese de enzimas específicas. Os mais importantes sinais químicos são os hormônios peptídicos secretados pela hipófise e várias prostaglandinas. Por exemplo, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é um hormônio peptídeo secretado pela hipófise que estimula a síntese dos esteróides adrenais. Uma das conseqüências da ligação do ACTH aos receptores da adrenal é o aumento da síntese do 17−α−hidroxilase e 11−β−hidroxilase. Em contraste, a prostaglandina F2α inibe a indução da síntese de progesterona nos ovários. Esse último processo é estimulado pelo hormônio luteinizante (LH), uma proteína também produzida pela hipófise.

O processo enzimático no qual o colesterol é convertido a esteróides biologicamente ativos, também como o modo pelos quais os esteróides são inativados e preparados para a excreção, compreende um elaborado mecanismo conhecido como biotransformação. Durante a biotransformação as mesmas (em alguns casos similares) enzimas são também usadas para solubilizar o xenobiótico hidrofóbico para torná-los mais facilmente excretados. A biotransformação do colesterol em ácidos biliares é descrito a seguir.

10.8 Eicosanóides

Os eicosanóides são substâncias fisiologicamente ativas que atuam como potentes biosinalizadores produzidos na maioria dos tecidos dos mamíferos. Mediam uma grande variedade de processos fisiológicos, tais como, a contração de músculos lisos, inflamação, percepção da dor e a regulação do fluxo sangüíneo. Os eicosanóides também estão relacionados com várias doenças como o infarto do miocárdio e artrite reumatóide. Como agem nos tecidos próximos das células que os produzem, os eicosanóides são chamados reguladores *autócrinos* e não de hormônios que são transportados pela corrente sangüínea até os sítios de ação.

A maioria dos eicosanóides são derivados do ácido araquidônico ($20{:}4^{\Delta 5,8,11,14}$), sintetizado a partir do linoleato pela adição de uma unidade de três carbonos seguida pela descarboxilação e dessaturação.

COO⁻

Linoleato 18:2 ($\Delta^{9,12}$)

Dessaturação

COO⁻

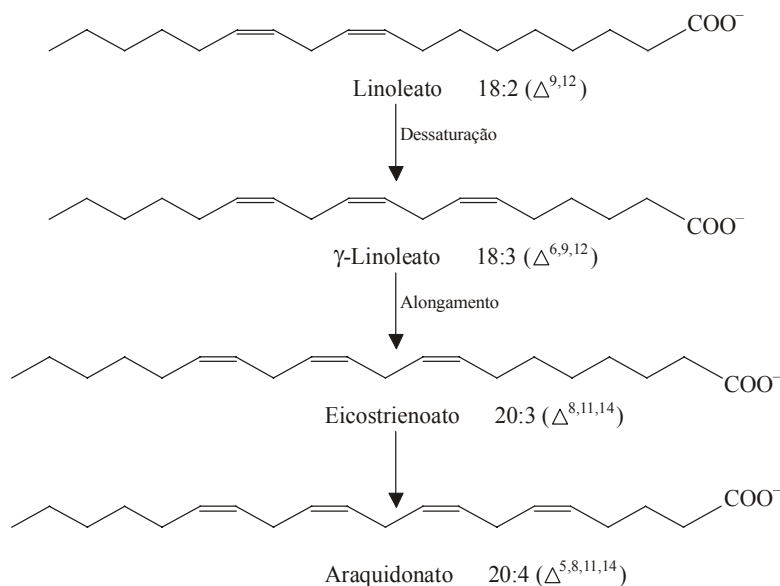
γ-Linoleato 18:3 ($\Delta^{6,9,12}$)

Alongamento

COO⁻

Eicostrienoato 20:3 ($\Delta^{8,11,14}$)

COO⁻

Araquidonato 20:4 ($\Delta^{5,8,11,14}$)

Quase todo ácido araquidônico é armazenado nas membranas celulares como ésteres no C2 do glicerol nos fosfoglicerídeos. A produção de eicosanóides inicia após a liberação do ácido araquidônico a partir de moléculas de fosfolipídeos das membranas pela ação da enzima fosfolipase A_2 ativada por estímulo hormonal e outros. Os eicosanóides, que incluem as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos, são ativos por curtos períodos (muitas vezes medidos em segundos ou minutos) e produzidos em pequenas quantidades.

A. Prostaglandinas

São derivados do ácido araquidônico que contém um anel de ciclopentano com grupos hidróxi em C11 e C15. As moléculas que pertencem a série E das prostaglandinas tem um grupo carbonila em C9, enquanto as moléculas da série F tem um grupo OH na mesma posição. O número subescrito no nome das prostaglandinas indica o número de ligações duplas na molécula. A série 2, derivada do ácido araquidônico, parece ser o grupo mais importante de prostaglandinas em humanos.

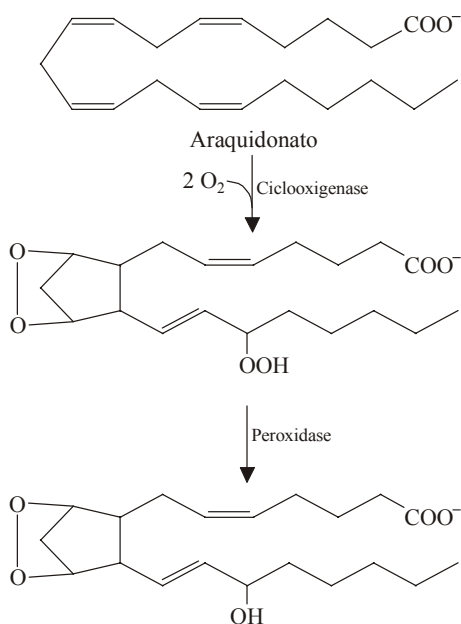
No retículo endoplasmático liso, as enzimas *cicloxigenase* (COX) e *peroxidase* catalisam a transformação do araquidonato em PGH_2, o precursor de muitas prostaglandinas e tromboxanos. O PGH_2 sofre modificações adicionais, dependendo do tecido.

Araquidonato

$2\ O_2$ Ciclooxigenase

OOH

Peroxidase

OH

As prostaglandinas estão envolvidas em uma grande variedade de funções de controle. Por exemplo, as prostaglandinas promovem a inflamação e processos que produzem dor e febre. Atuam nos processos reprodutivos (exemplo, ovulação e contrações uterinas) e digestão (exemplo, inibição da secreção gástrica). Ações biológicas adicionais de algumas prostaglandinas são mostradas na Figura 10.15.

O bloqueio da produção de prostaglandinas pela inibição das enzimas de síntese implica no alívio da dor e da inflamação mediadas pelas prostaglandinas. Por exemplo, os glicocorticóides exercem importantes ações antiinflamatórias por suprimir a resposta imune por meio da inibição da expressão de ciclooxigenase. Existem duas formas de cicloxigenase: *COX1* e *COX2*. A enzima COX2 pode ser induzida em células inflamatórias. A supressão da síntese de COX2 por glicocorticóides exerce importantes efeitos antiinflamatórios. Vários outros inibidores são utilizados como antiinflamatórios tais como, a aspirina, ibuprofeno (antiinflamatório não esteróide), paracetamol (Tylenol®), Celebrex® e Vioxx®.

B Tromboxanos.

São também derivados do ácido araquidônico. Diferem de outros eicosanóides por possuir um anel cíclico éter. O tromboxano A_2 (TXA_2), o mais proeminente membro do grupo dos eicosanóides, é principalmente produzido pelas plaquetas (fragmentos celulares que iniciam o processo de coagulação sangüínea). Uma vez liberado, o TXA_2 promove a agregação plaquetária e a vasoconstrição. A ingestão regular de pequenas doses de aspirina reduzem a probabilidade de infartos do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais pela inibição da síntese de tromboxana.

C. Leucotrienos

São derivados lineares do ácido araquidônico cuja síntese é iniciada por uma reação de peroxidação. Os vários leucotrienos diferem na posição do peróxido e na natureza do grupo tioéter atacado perto do local da peroxidação. O nome leucotrienos lembra que eles foram descobertos nos leucócitos (glóbulos brancos) e possuem um trieno (três duplas ligações conjugadas) em suas estruturas. (O termo conjugado indica que as duplas ligações carbono-carbono são separadas por uma ligação carbono-carbono simples). Atuam como mediadores da inflamação e nas reações alérgicas. Os leucotrienos LTC_4, LTD_4 e LTE_4 foram identificados como componentes da SRS-A (substância de reação lenta da anafilaxia). (O subescrito no nome do leucotrieno indica o número total de ligações duplas). *Anafilaxia* é o tipo imediato e transitório de reação imunológica (alérgica), caracterizada pela contração dos músculos lisos e dilatação dos capilares em decorrência da liberação de substâncias farmacologicamente ativas (histamina, bradicinina, serotonina e substância de reação lenta). Durante a inflamação (uma resposta normal à lesão tecidual) essas moléculas aumentam a perda de líquidos dos vasos sangüíneos das áreas afetadas. O LTB_4, um potente agente quimiotático, atrai leucócitos (infection–fighting). (agentes quimiotático são também chamados como quimioatrativos). Outros efeitos dos leucotrienos incluem a vasoconstrição e a broncoconstrição (ambos causados pela contração do músculo liso nos vasos sangüíneos e das passagens de ar nos pulmões) e edema (aumento da permeabilidade capilar que causa a perda de líquidos dos vasos sangüíneos).

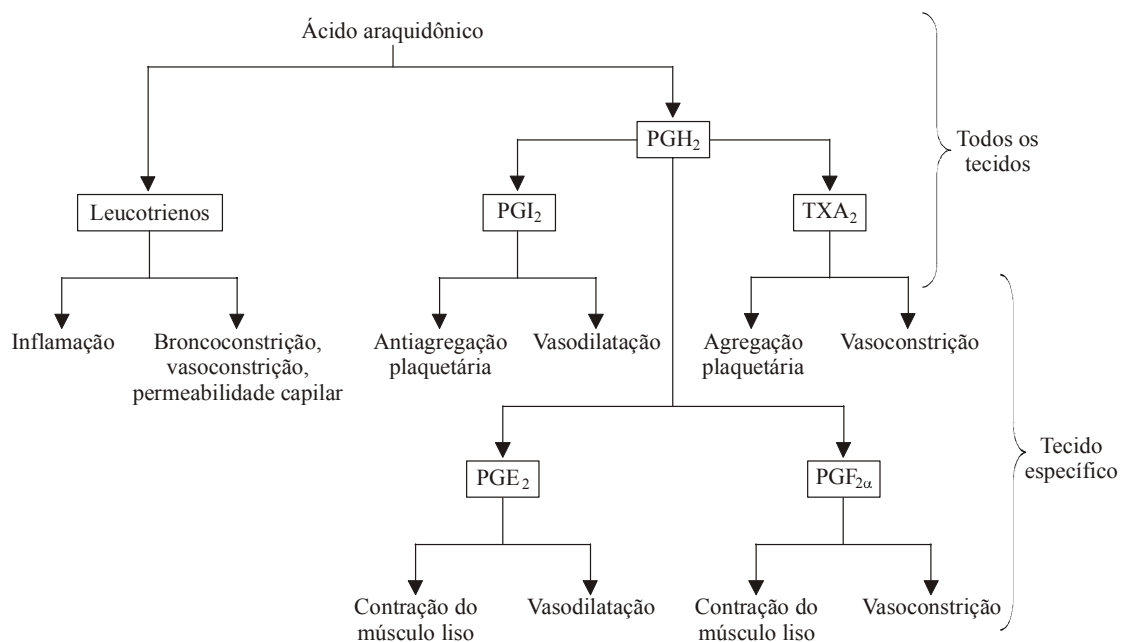



Figura 10.15
Ações biológicas de algumas moléculas de eicosanóides

Resumo

1. A acetil−CoA exerce papel central na maioria dos processos metabólicos relacionados aos lipídeos. Por exemplo, a acetil−CoA é usada na síntese dos ácidos graxos. Quando os ácidos graxos são degradados para gerar energia, o produto é a acetil−CoA.
2. Dependendo das necessidades energéticas, as novas moléculas de gordura são empregadas para a geração de energia ou são armazenadas nos adipócitos. Quando as reservas de energia do organismos estão baixas, as gorduras armazenadas são mobilizadas em processo denominado lipólise. Na lipólise, os triacilgliceróis são hidrolizados em ácidos graxos e glicerol. O glicerol é transportado para o fígado, onde pode ser usado na síntese de lipídeos ou glicose. A maior parte dos ácidos graxos são degradados para formar acetil−CoA na mitocôndria em processo denominado β−oxidação. A β−oxidação nos peroxissomos encurtam os ácidos graxos muito longos. Outras reações degradam ácidos graxos de cadeia ímpar e insaturados. Quando o produto de degradação dos ácidos graxos (acetil−CoA) está presente em excesso, são produzidos corpos cetônicos.
3. A síntese dos ácidos graxos inicia com a carboxilação da acetil−CoA para formar malonil−CoA. As demais reações da síntese dos ácidos graxos são realizadas pelo complexo ácido graxos sintase. Várias enzimas estão disponíveis para o alongamento e o processo de dessaturação dos ácidos graxos da dieta e sintetizados.
4. Após a síntese dos fosfolipídeos na interface do sistema retículo endotelial e citoplasma, eles são muitas vezes "remodelados", ou seja, a composição de seus ácidos graxos é ajustada. O *turnover* (degradação e reposição) dos fosfolipídeos, mediado por fosfolipases, é rápido.
5. A síntese do componente ceramida dos esfingolipídeos inicia com a condensação do palmitoil−CoA com a serina para formar 3−cetoesfingamina. Em processo de duas etapas envolvendo a acil−CoA e $FADH_2$, esfinganina (formada quando a 3−cetoesfinganina é reduzida pelo NADPH) é convertida a ceramida. Os esfingolipídeos são degradados nos lisossomos.
6. As proteínas translocadoras de fosfolipídeos, as proteínas de troca de proteínas e as vesículas de transição estão envolvidas em um complicado processo de síntese de membrana e entrega de componentes da membrana para seus destinos celulares.
7. A síntese de colesterol pode ser dividida em três etapas: formação de HMG−CoA a partir de acetil−CoA, conversão de HMG−CoA a esqualeno e transformação do esqualeno a colesterol. O colesterol é o precursor de todos os hormônios esteróides e de sais biliares. Os sais biliares são usados para emulsificar a gordura da dieta.
8. A primeira etapa na síntese dos eicosanóides é a liberação do ácido araquidônico do C2 do glicerol das moléculas de fosfoglicerídeos da membrana. A ciclooxigenase converte o ácido araquidônico em PGG_2, que é um precursor das prostaglandinas e tromboxanos. A lipoxigenase converte o ácido araquidônico em precursores dos leucotrienos.

Referências

HORTON, H. R., MORAN, L. A., OCHS, R. S., RAWN, J. D., SCRIMGEOUR, K. G. **Principles of biochemistry.** 3 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2002. p. 264-303.

McKEE, T., McKEE, J.R. **Biochemistry:** The molecular basis of live. 3 ed. New York: McGraw-Hill, 2003. p. 373-416.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger:** Princípios de bioquímica. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 599-638.

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica.** Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 562-610.

11

Metabolismo do Nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial encontrado em proteínas, em ácidos nucléicos e em outras biomoléculas. Apesar do importante papel que exerce nos organismos vivos, o nitrogênio utilizado biologicamente é escasso. Embora o nitrogênio molecular (N_2) seja abundante na biosfera, ele é quase inerte quimicamente. Portanto, a conversão do N_2 para a forma utilizável necessita gasto de energia. Certos microorganismos podem reduzir o N_2 para formar NH_3 (amônia). As plantas e os microorganismos absorvem NH_3 e NO_3^- (íon nitrato), o produto de oxidação da amônia. As duas moléculas são usadas para a síntese de biomoléculas contendo nitrogênio. Os animais não sintetizam moléculas contendo nitrogênio a partir de amônia e nitrato. Em lugar disso, eles obtêm “nitrogênio orgânico”, (principalmente aminoácidos) da dieta. Em uma complexa série de vias, os animais usam o nitrogênio dos aminoácidos para sintetizar vários compostos orgânicos.

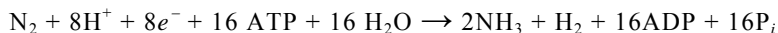
O nitrogênio é encontrado em inúmeras biomoléculas, como por exemplo, aminoácidos, bases nitrogenadas, porfirinas e alguns lipídeos. Muitos metabólitos contendo nitrogênio são necessários em pequenas quantidades (ex.: aminas biogênicas e glutationa).

11.1 Fixação de nitrogênio

Várias circunstâncias limitam a utilização do nitrogênio atmosférico nos seres vivos. Devido a estabilidade química do nitrogênio molecular atmosférico, a redução do N_2 até íon amônio (NH_4^+) (denominado *fixação do nitrogênio*) necessita de grande quantidade de energia. Por exemplo, no mínimo 16 ATP são necessários para reduzir um N_2 a duas NH_3. Além disso, somente alguns procariotos podem “fixar” nitrogênio. Entre eles estão as bactérias (*Azotobacter vinelendii* e *Clostridium pasteurianum*), as cianobactérias (*Nostoc muscorum* e *Anabaena azollae*) e as bactérias simbiontes (várias espécies de *Rhizobium*) localizadas em nódulos de raízes de plantas leguminosas como soja e alfafa.

As espécies fixadoras de nitrogênio possuem um *complexo da nitrogenase,* cuja estrutura consiste de duas proteínas chamadas dinitrogenase e dinitrogenase−redutase. A dinitrogenase (MoFe−proteína) é um $\alpha_2\beta_2$-heterotetrâmero que contêm dois átomos de molibdênio (Mo) e 30 átomos de ferro. A dinitrogenase−redutase (Fe−proteína) é um dímero de

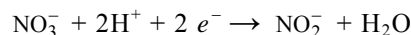
subunidades idênticas. O complexo da nitrogenase catalisa a produção de amônia a partir do nitrogênio molecular:

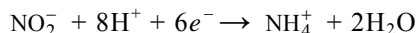
$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16\ ATP + 16\ H_2O \longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$$

São necessários oito elétrons para a reação: seis para a redução do N_2 e dois para produzir H_2. Os dois componentes do complexo da nitrogenase são inativados irreversivelmente pelo oxigênio e, porisso, muitas bactérias fixadoras de oxigênio ficam confinadas em ambientes anaeróbicos.

Em condições fisiológicas, a amônia existe principalmente na forma protonada, NH_4^+ (íon amônio) (pK' 9,25).

A. Nitrificação e desnitrificação

O nitrogênio biologicamente útil também é obtido a partir do íon nitrato (NO_3^-) presente na água e no solo. O nitrato é reduzido a íon amônio pelas plantas, fungos e muitas bactérias. Primeiro, a nitrato–redutase catalisa a redução de dois elétrons do íon nitrato a íon nitrito (NO_2^-):

$$NO_3^- + 2H^+ + 2\ e^- \longrightarrow NO_2^- + H_2O$$

A seguir, a nitrito–redutase converte o nitrito a íon amônio:

$$NO_2^- + 8H^+ + 6e^- \longrightarrow NH_4^+ + 2H_2O$$

O nitrato é também produzido por certas bactérias que oxidam o NH_4^+ a NO_2^- e a seguir até NO_3^-, em processo chamado *nitrificação*. Outros organismos convertem o íon nitrato e o íon nitrito de volta a N_2 para a atmosfera, em mecanismo chamado *desnitrificação*. Todas essas reações constituem o *ciclo do nitrogênio*. (Figura 11.1).

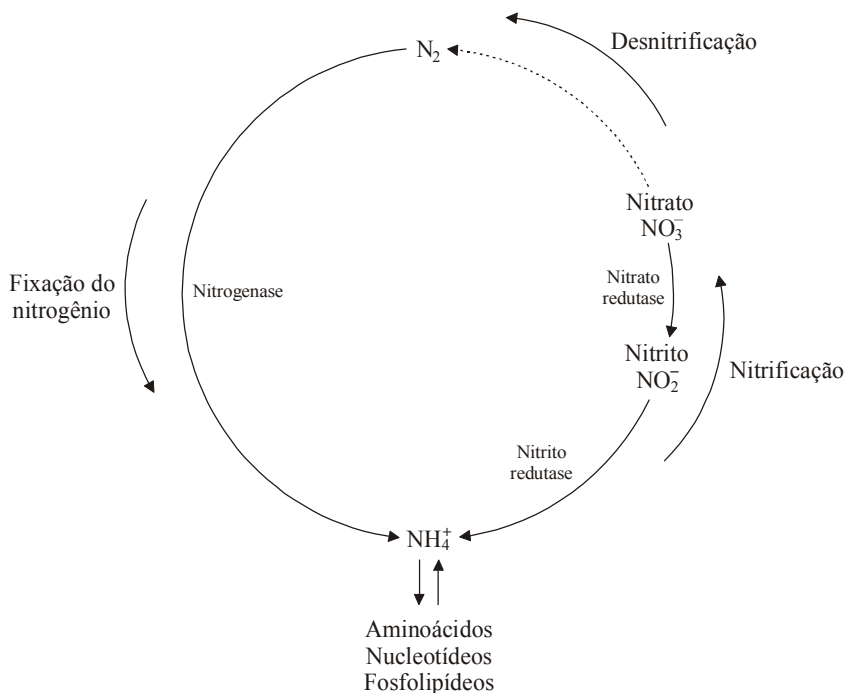



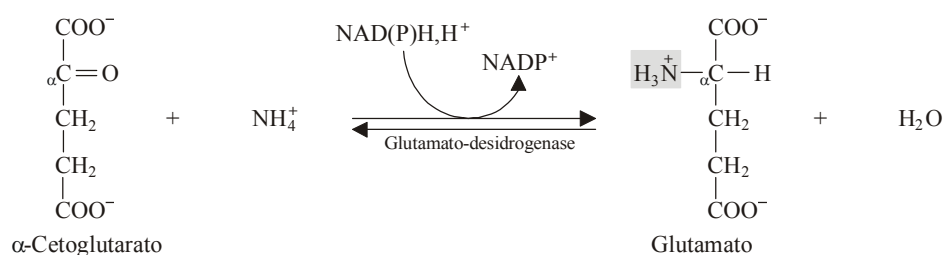
Figura 11.1

Ciclo do nitrogênio. A fixação do nitrogênio converte N_2 em íon amônio útil biologicamente. O nitrato também pode ser convertido a íon amônio. A amônia é transformada de volta a N_2 por nitrificação seguida por desnitrificação.

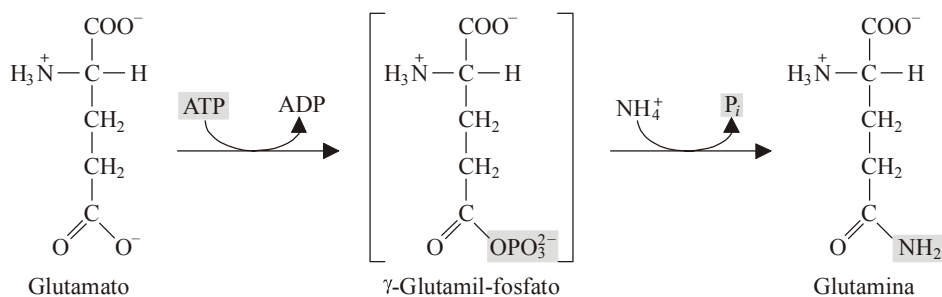
B. Incorporação de íons amônio em aminoácidos

Existem duas vias principais para a incorporação de íons amônio para formar aminoácidos e, a seguir, outras biomoléculas: (1) aminação redutiva de α−cetoácidos e (2) formação de amidas de ácido aspártico e de ácido glutâmico com a subsequente transferência do nitrogênio amida para formar outros aminoácidos.

A *glutamato−desidrogenase*, uma enzima encontrada na mitocôndria e citoplasma de células eucarióticas e em algumas bactérias, catalisa a incorporação de íons amônio ao α−cetoglutarato:

$$\underset{\alpha\text{-Cetoglutarato}}{^{-}OOC-CH_2-CH_2-\overset{\alpha}{C}(=O)-COO^-} + NH_4^+ \underset{\text{Glutamato-desidrogenase}}{\overset{NAD(P)H,H^+ \;\rightarrow\; NADP^+}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{Glutamato}}{^{-}OOC-CH_2-CH_2-\overset{\alpha}{C}H(\overset{+}{N}H_3)-COO^-} + H_2O$$

Em eucariotos, a desidrogenase também libera íons amônio para a excreção de nitrogênio a partir do glutamato proveniente, sobretudo, das reações de transaminação. Como a reação é reversível, o excesso de amônia promove a síntese de glutamato. A glutamato−desidrogenase é uma enzima alostérica ativada pelo ADP e o GDP, e inibida pelo ATP e o GTP.

Os íons amônio são também incorporados ao glutamato para formar glutamina em presença da *glutamina−sintetase,* enzima encontrada em todos os organismos. Nos microrganismos, é um ponto crítico de entrada para a fixação de nitrogênio. Em animais, é a principal via de conversão de íons amônio – compostos altamente tóxicos – em glutamina para ser transportada no sangue. Na primeira etapa da reação, o ATP doa um grupo fosforil para o glutamato. A seguir, os íons amônio reagem com o intermediário (γ−glutamil−fosfato), deslocando o P_i para produzir glutamina.

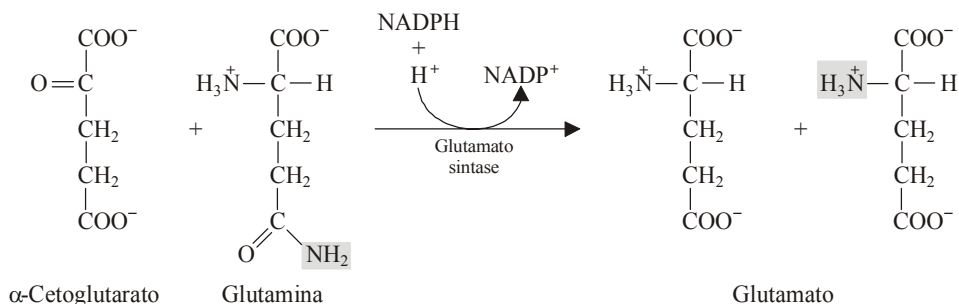
$$\underset{\text{Glutamato}}{H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-C(=O)O^-} \xrightarrow{ATP \;\rightarrow\; ADP} \left[\underset{\gamma\text{-Glutamil-fosfato}}{H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-C(=O)OPO_3^{2-}}\right] \xrightarrow{NH_4^+ \;\rightarrow\; P_i} \underset{\text{Glutamina}}{H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-C(=O)NH_2}$$

O nome *sintetase* indica que o ATP é consumido na reação.

O cérebro, uma fonte rica em glutamina−sintetase, é especialmente sensível aos efeitos tóxicos de íons amônio. As células do cérebro convertem íons amônio em glutamina, uma molécula neutra e não−tóxica.

A glutamina é, então, transportada ao fígado, onde ocorre a produção de compostos nitrogenados para a excreção.

Em muitos organismos, a glutamina e o glutamato estão presentes em concentrações mais elevadas que outros aminoácidos, o que é consistente com seu papel de carreador de aminoácidos. Sendo assim, a atividade da glutamina−sintetase é fortemente regulada para manter o suprimento adequado de aminoácidos. Por exemplo, a glutamina−sintetase dodecamérica da *E. Coli* é regulada alostericamente e por modificação covalente.

Em bactérias e vegetais, a enzima *glutamato−sintase* catalisa a aminação redutiva do α−cetoglutarato empregando a glutamina como doadora de nitrogênio e o $NADH_2$ como doador de elétrons (exemplo, em raízes e sementes) e, em algumas plantas, a ferrodoxina reduzida (exemplo, em folhas):

$$\underset{\alpha\text{-Cetoglutarato}}{{}^{-}OOC-CH_2-CH_2-C(=O)-COO^{-}} + \underset{\text{Glutamina}}{H_3\overset{+}{N}-CH(COO^{-})-CH_2-CH_2-C(=O)NH_2} \xrightarrow[\text{Glutamato sintase}]{NADPH + H^{+} \;\rightarrow\; NADP^{+}} \underset{\text{Glutamato}}{H_3\overset{+}{N}-CH(COO^{-})-CH_2-CH_2-COO^{-} + H_3\overset{+}{N}-CH(COO^{-})-CH_2-CH_2-COO^{-}}$$

(as reações catalisadas pelas sintases não requerem ATP). O resultado das reações da glutamina−sintetase e glutamato−sintase é

$$\alpha\text{−Cetoglutarato} + NH_4^+ + NADPH + ATP \longrightarrow$$

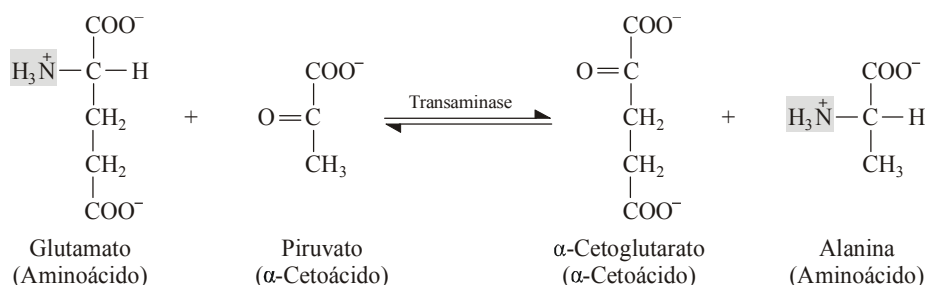
$$\text{glutamato} + NADP^+ + ADP + P_i$$

Em resumo, a ação combinada das duas reações incorpora o nitrogênio (íon amônio) em um composto orgânico (α−cetoglutarato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico) para produzir aminoácidos (glutamato). Os mamíferos não possuem a glutamato−sintase, mesmo assim, as concentrações de glutamato nesses organismos são relativamente altas porque o aminoácido é produzido por outras reações.

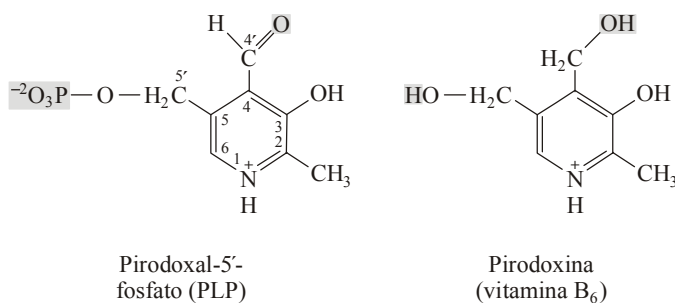
11.2 Transaminação

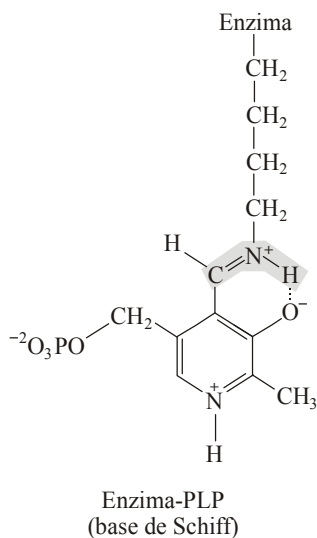
As *transaminases* (também chamadas *amino−transferases*) catalisam a transferência reversivel de grupos α−amino de um aminoácido para um α −cetoácido para produzir um α−cetoácido do aminoácido original e um novo aminoácido. Por exemplo:

Transaminase

Glutamato (Aminoácido) + Piruvato (α-Cetoácido) ⇌ α-Cetoglutarato (α-Cetoácido) + Alanina (Aminoácido)

As transaminases requerem *piridoxal–5´–fosfato* (PLP) como coenzima. Este composto é a forma fosforilada da piridoxina (vitamina B_6):

Pirodoxal-5´-fosfato (PLP)

Pirodoxina (vitamina B_6)

A PLP está covalentemente ligada ao sítio ativo da enzima via base de Schiff (R'−CH=N−R, uma aldimina) ligada ao grupo ε-amino do resíduo de lisina:

Enzima-PLP (base de Schiff)

Forças estabilizadoras adicionais incluem interações iônicas entre as cadeias laterais de aminoácidos e o anel piridinium e o grupo fosfato.

As reações de transaminação exercem papeis centrais tanto na síntese como degradação dos aminoácidos. Além disso, essas reações envolvem a interconversão de aminoácidos a piruvato ou ácidos dicarboxílicos, e atuam como ponte entre o metabolismo dos aminoácidos e os carboidratos.

α-Aminoácido

Piridoxal-fosfato

H_2O ⇌ H_2O

Base de Schiff

H^+ ⇌ H^+

Cabânion

Intermediário quinonóide

H^+ ⇌ H^+

H_2O ⇌ H_2O

α-Cetoácido

Piridoxamina-fosfato

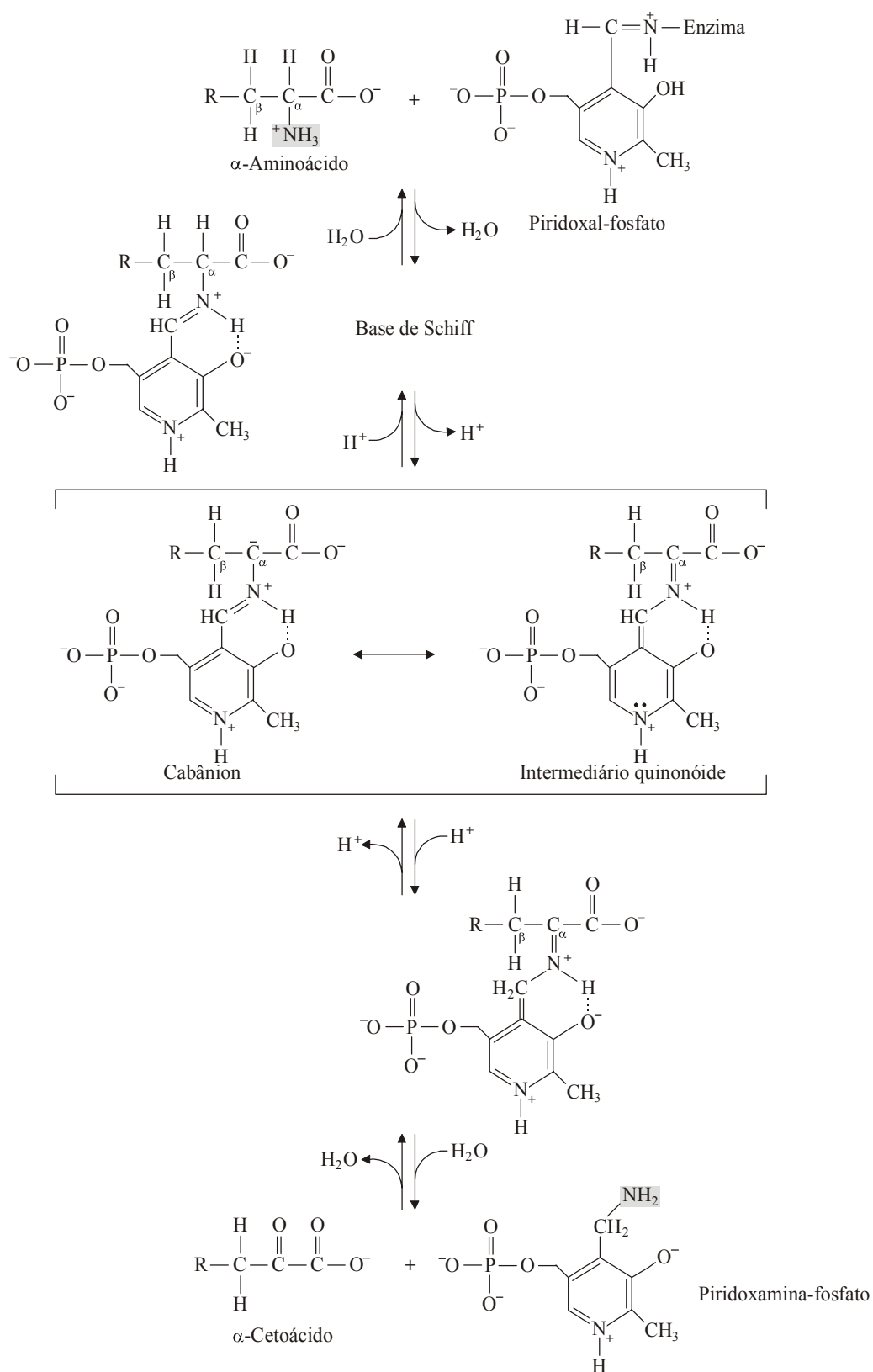



Figura 11.2
Papel do piridoxal -5'-fosfato na transaminação.

11.3 Aminoácidos essencias e não–essencias

Os aminoácidos diferem de outras classes de biomoléculas pois cada membro é sintetizado por via única. Apesar da diversidade das vias sintéticas, o esqueleto carbonado de cada aminoácido é derivado dos mesmos intermediários metabólicos: o piruvato, o oxalacetato, o α–cetoglutarato e o 3–fosfoglicerato. A tirosina, sintetizada a partir da fenilalanina, é uma exceção.

Os aminoácidos sintetizados em quantidades suficientes por mamíferos a partir da amônia e de esqueletos carbonados, são denominados *não–essenciais*; ou seja, eles eståo disponíveis para as células mesmo quando não incluídos na dieta. Por outro lado, os aminoácidos *essenciais* são aqueles não sintetizados ou sintetizados em velocidade inadequada às necessidades metabólicas do organismo e, portanto, devem ser ingeridos na dieta. Os aminoácidos essenciais e não–essenciais estão listados na Tabela 11.1.

Tabela 11.1 – Aminoácidos essenciais e não–essenciais no homem

Essenciais	Não–essenciais
Arginina	Alanina
Histidina*	Asparagina
Isoleucina	Aspartato
Leucina	Cisteína
Lisina	Glutamato
Metionina	Glutamina
Fenilalanina	Glicina
Treonina	Hidroxiprolina
Triptofano	Prolina
Valina	Serina
	Tirosina

* A histidina é essencial no mínimo até os 12 anos de idade

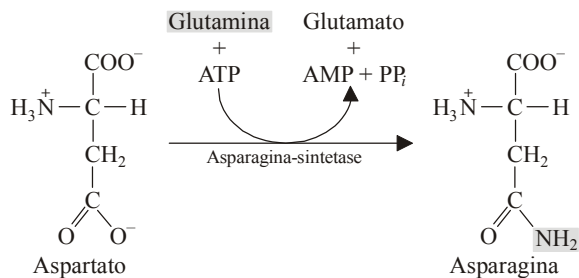
As fontes exógenas de proteínas diferem consideravelmente em suas proporções de aminoácidos essenciais. Em geral, os aminoácidos essências são encontrados em maior quantidade em proteínas de origem animal (exemplo, carne, leite e ovos). As proteínas vegetais muitas vezes são carentes de um ou mais desses aminoácidos. Por exemplo, a gliadina (proteína do trigo) tem quantidade insuficiente de lisina enquanto a zeína (proteína do milho) tem baixo conteúdo de lisina e triptofano. Como as proteínas vegetais diferem em sua composição de aminoácidos, é possível obter aminoácidos essenciais em quantidades apropriadas a partir da combinação de diversos vegetais. Por exemplo, o feijão (metionina baixa) associado com cereais (lisina baixa).

As rotas biossintéticas para a produção de aminoácidos não–essenciais são descritas a seguir. Ao considerar estes processos, deve-se compreender que se algum destes aminoácidos for excluido da dieta, pode ocorrer uma elevada demanda de aminoácidos essenciais, pois parte destes últimos são utilizados na síntese de não–essenciais. Por exemplo, a tirosina é classificada como não–essencial pois é formada a partir da fenilalanina. Entretanto, na ausência de tirosina exógena, a quantidade de fenilalanina necessária aumenta significativamente.

A. Biossíntese de aminoácidos não–essenciais

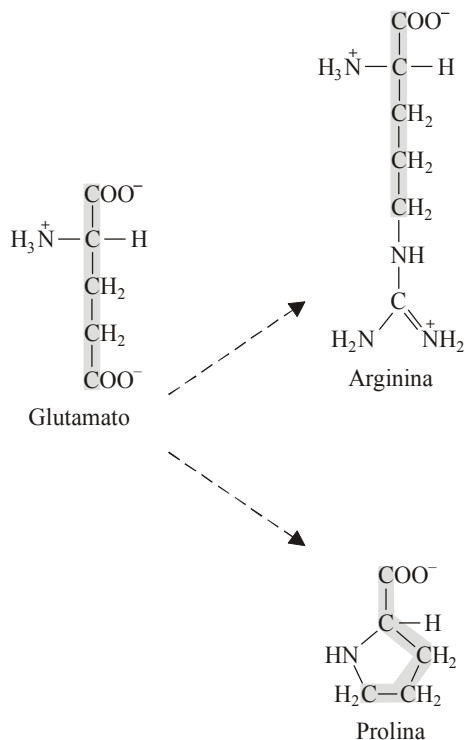
Em mamíferos, os aminoácidos não–essenciais são sintetizados a partir de várias fontes, tais como, os aminoácidos essenciais (tirosina por hidroxilação da fenilalanina) ou de intermediários metabólicos comuns: o piruvato, o oxalacetato, o α–cetoglutarato e o 3–fosfoglicerato.

Alguns aminoácidos são formados por reações de transaminação. Por essa via, a *alanina* é produzida a partir do piruvato, o *glutamato* a partir do α–cetoglutarato e o *aspartato* a partir do oxaloacetato. A glutamina–sintetase catalisa a amidação do glutamato para produzir *glutamina*. A asparagina–sintetase, emprega a glutamina como doador de grupo amino e converte o aspartato em asparagina:

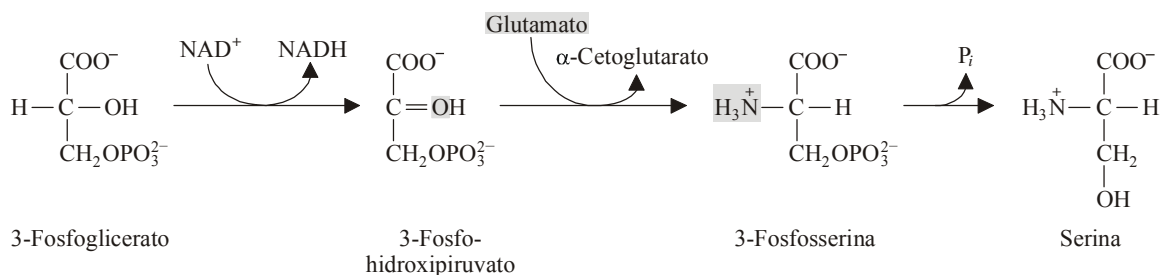
Aspartato + Glutamina + ATP → (Asparagina-sintetase) → Asparagina + Glutamato + AMP + PP_i

Somente três intermediários metabólicos (piruvato, oxaloacetato e α–cetoglutarato) fornecem cinco dos dez aminoácidos não–essenciais por reações de transaminação e amidação.

Vias mais complexas convertem glutamato em prolina e arginina:

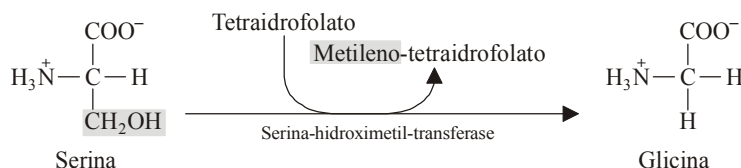
Glutamato → Arginina

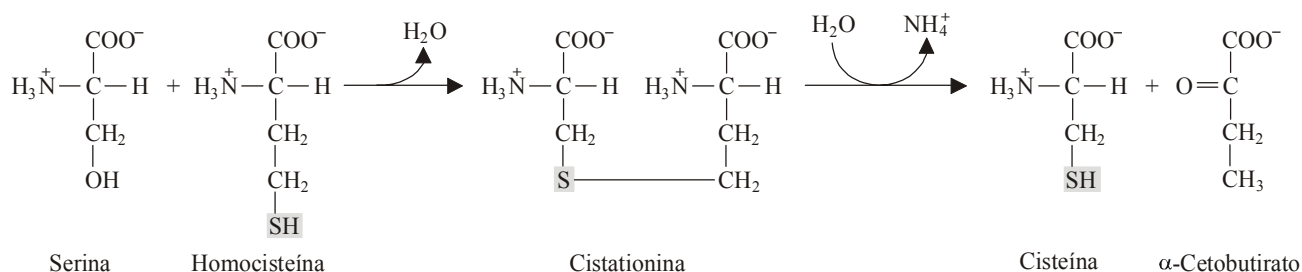
Glutamato → Prolina

A *serina* tem como precursor a 3–fosfoglicerato, um intermediário da glicólise. A síntese ocorre em três reações:

NAD$^+$ → NADH; Glutamato → α-Cetoglutarato; P_i

3-Fosfoglicerato → 3-Fosfo-hidroxipiruvato → 3-Fosfosserina → Serina

A serina, um aminoácido com três carbonos, produz glicina com dois carbonos em reação catalisada pela serina−hidroximetil−transferase (a reação reversa converte glicina em serina). A enzima emprega um mecanismo dependente de piridoxal−5'−fosfato (PLP) para remover o grupo hidroximetil ($-CH_2OH$) ligado ao carbono α da serina; o fragmento de um carbono é então transferido para o co−fator tetrahidrofolato (THF) (*ver* Seção 11.11.b).

Tetraidrofolato → Metileno-tetraidrofolato

Serina → Glicina (Serina-hidroximetil-transferase)

O esqueleto carbonado da serina é utilizado para a síntese de *cisteína*. A reação envolve a condensação da serina com a homocisteína para formar cistationina que por clivagem produz cisteína, α−cetobutirato e amônia. Estas reações são catalisadas pela cistationina−β−sintetase e cistationina−β −liase, respectivamente:

Serina + Homocisteína → (H_2O) Cistationina → (H_2O, NH_4^+) Cisteína + α-Cetobutirato

A homocisteína é derivada da metionina pela formação do intermediário *S*−adenosilmetionina. A transferência do grupo metila deste último, libera a *S*−adenosil−homocisteína, que é clivada à homocisteína. Enquanto os carbonos da cisteína são derivados da serina, o enxôfre é obtido unicamente a partir da metionina (em processo denominado transsulfuração). Restrição de cisteína na dieta deve ser compensada por um aumento na ingestão de metionina.

B. Biossíntese de aminoácidos essencias

Os aminoácidos essenciais são sintetizados por vias que necessitam várias etapas. Em algum ponto da evolução, os animais perderam a capacidade de sintetizar esses aminoácidos, provavelmente porque as vias consumiam muita energia e os compostos já existiam em alimentos. Em

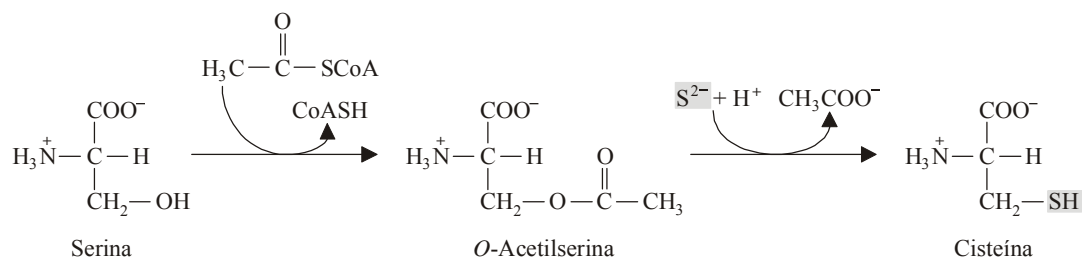
resumo, os humanos não sintetizam aminoácidos ramificados ou aromáticos e, também, não incorporam enxôfre em compostos como a metionina.

Foi descrito acima que a síntese da cisteína em mamíferos necessita um átomo de enxôfre derivado, em última instância, da metionina. Em bactérias, a síntese de metionina requer um átomo de enxôfre derivado da cisteína. O enxôfre proveniente do sulfeto inorgânico substitui o grupo acetila da *O*–acetilserina (obtida por acilação da serina) para produzir cisteína..

$H_3C-C(=O)-SCoA$ → CoASH

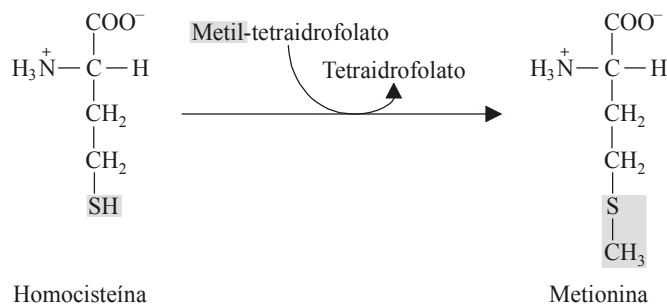
$S^{2-} + H^+$ → CH_3COO^-

$H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-OH$ → $H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-O-C(=O)-CH_3$ → $H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-SH$

Serina | *O*-Acetilserina | Cisteína

A cisteína doa, então, o átomo de enxôfre para a homocisteína, cujo esqueleto de quatro carbonos é derivado do aspartato. A etapa final da síntese da metionina é catalisada pela metionina–sintase, que adiciona à homocisteína um grupo metila transportado pelo tetrahidrofolato;

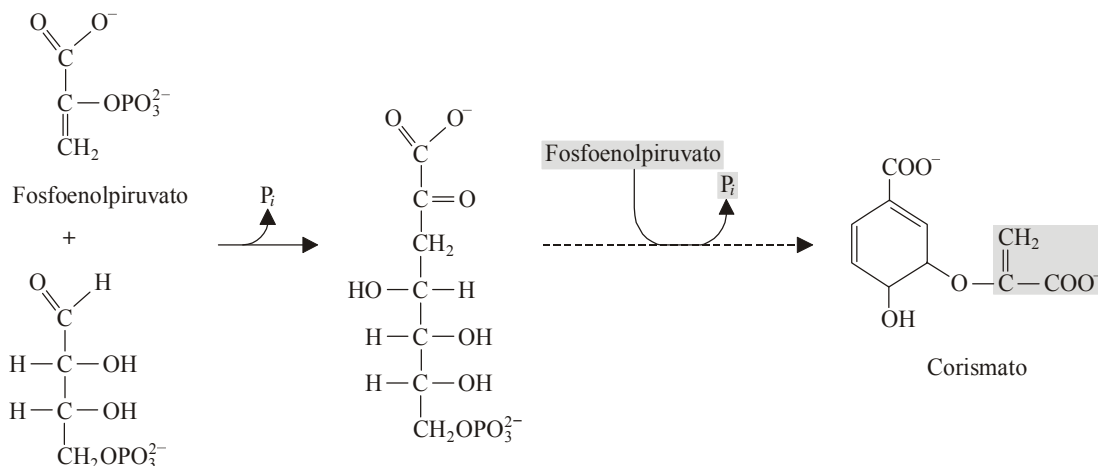
Metil-tetraidrofolato → Tetraidrofolato

$H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-SH$ → $H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-S-CH_3$

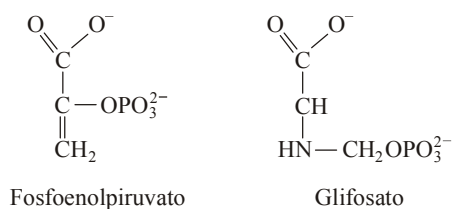
Homocisteína | Metionina

Em humanos, níveis elevados de homocisteína no sangue estão associados com a doença cardiovascular. A relação foi inicialmente descoberta em indivíduos com homocistinúria, uma desordem em que o excessso de homocisteína é excretada na urina. Esses indivíduos desenvolvem aterosclerose ainda crianças, provavelmente porque a homocisteína danifica diretamente as paredes dos vasos sangüíneos mesmo em ausência de teores elevados de LDL. Aumentos na ingestão de folato, a vitamina precursora do tetraidrofolato, reduz o nível de homocisteína pela sua conversão em metionina.

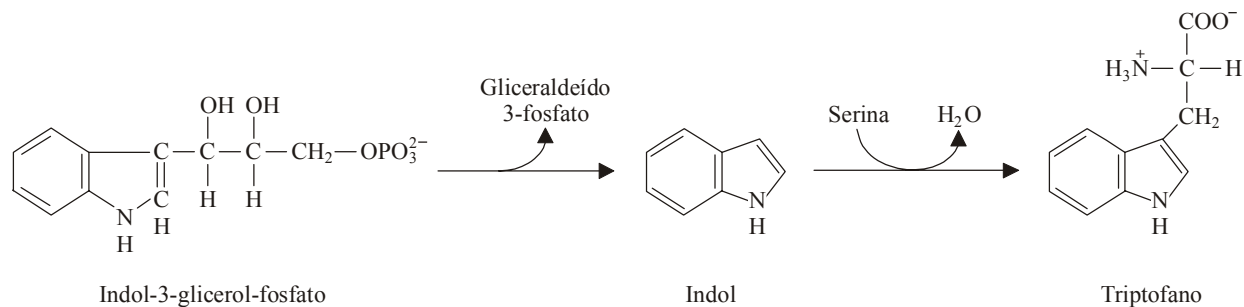
O aspartato, precursor da metionina, é também o precursor dos aminoácidos essenciais treonina e lisina. Como esses aminoácidos são derivados de outro aminoácido, eles já possuem o grupo amino. Os aminoácidos alifáticos (valina, leucina e isoleucina) são sintetizados por vias que empregam o piruvato como substrato inicial. Esses aminoácidos necessitam uma etapa catalisada por transaminase (com glutamato como substrato) para introduzir o grupo amino.

Em plantas e bactérias, a via de síntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) inicia com a condensação do fosfoenolpiruvato (um intermediário glicolítico com três carbonos) com a eritrose–4–fosfato (um intermediário de quatro carbonos na via pentose–fosfato). O produto da reação com sete carbonos cicliza e sofre

modificações adicionais, incluindo a adição de mais três carbonos do fosfoenolpiruvato, para formar o *corismato*, o intermediário comum na síntese dos três aminoácidos aromáticos.

Fosfoenolpiruvato + Eritrose-4-fosfato → P_i → Fosfoenolpiruvato, P_i → Corismato

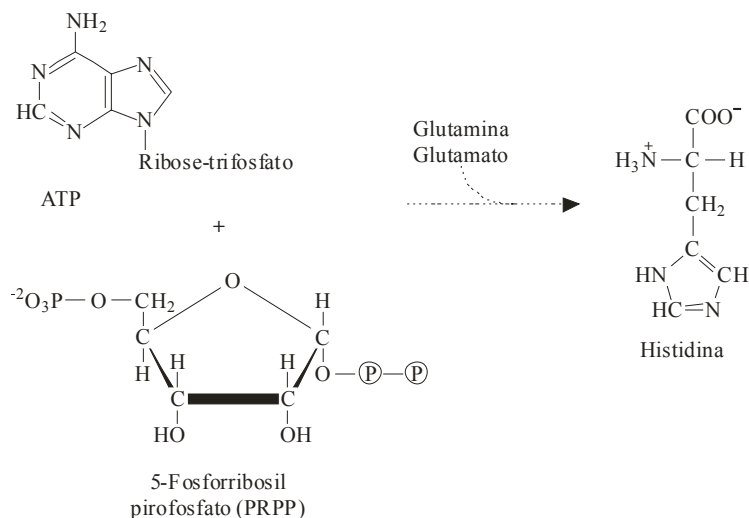
Como os animais não sintetisam o corismato, essa via é alvo de agentes que podem inibir o metabolismo de plantas sem afetar os animais. Por exemplo, o herbicida glifosato (Roundup®) compete com o segundo fosfoenolpiruvato na via que produz corismato.

Fosfoenolpiruvato   Glifosato

As duas reações finais da via biossintética do triptofano (que tem 13 etapas) são catalisadas pela triptofano−sintase, uma enzima bifuncional com uma estrutura quaternária $\alpha_2\beta_2$. A subunidade α cliva o indol−3−glicerol−fosfato gerando indol e gliceraldeído−3−fosfato. A seguir, a subunidade β adiciona serina ao indol para produzir triptofano.

Indol-3-glicerol-fosfato → (Gliceraldeído 3-fosfato) → Indol → (Serina, H_2O) → Triptofano

Indol, o produto da reação da subunidade α e o substrato para a reação da subunidade β, nunca se separa da enzima. Em vez disso, o intermediário indol se difunde entre os dois sítios ativos, não escapando para o solvente circundante. Esse fenômeno, no qual o intermediário de duas reações é

diretamente transferido de um sítio ativo a outro, é chamado *canalização* e aumenta a velocidade do processo ao evitar a perda de intermediários.

Somente um dos aminoácidos−padrão não é sintetizado a partir das principais vias que metabolizam os carboidratos: a histidina, para o qual, o ATP fornece um nitrogênio e um átomo de carbono. O glutamato e a glutamina doam os outros dois átomos de nitrogênio e os restantes cinco carbonos são derivados do 5−fosforribosil−pirofosfato (PRPP).

ATP + 5-Fosforribosil pirofosfato (PRPP) → (Glutamina, Glutamato) → Histidina

O 5−fosforribosil−pirofosfato é também fonte de ribose para os nucleotídeos. Isso sugere que a histidina talvez tenha sido um dos primeiros aminoácidos sintetizados nos primórdios da vida realizando a transição de um metabolismo todo−RNA para um RNA−e−proteína.

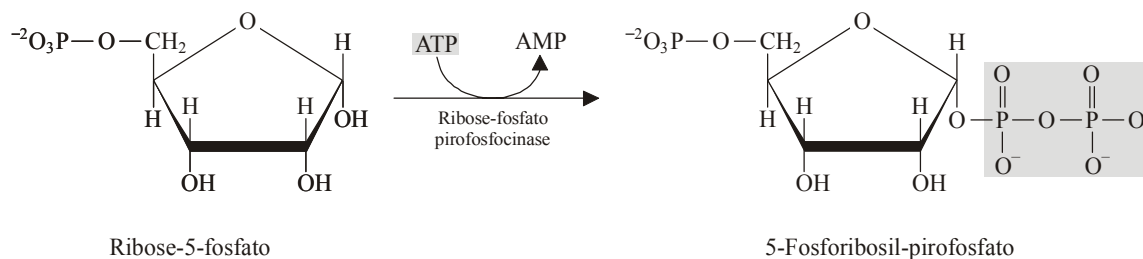
11.4 Biossíntese de nucleotídeos

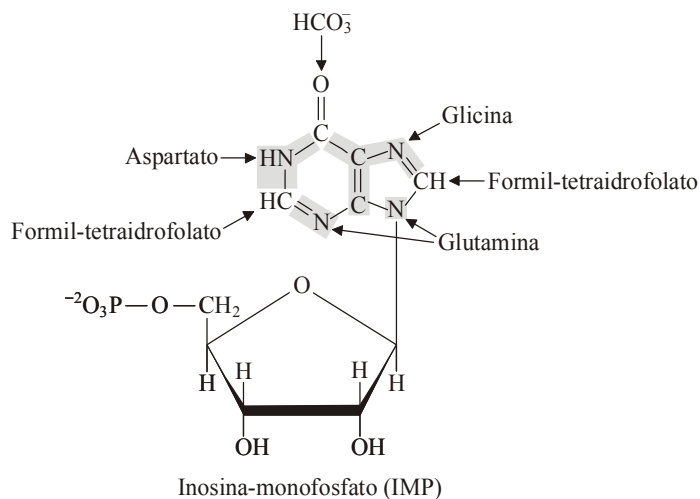
Os nucleotídeos são sintetizados a partir de precursores metabólicos: aminoácidos, ribose−5−fosfato, CO_2 e NH_3 (via “de novo”) . O organismo humano também recicla nucleotídeos a partir dos produtos de degradação de ácidos nucléicos e de co-fatores nucleotídeos (via de recuperação). Apesar do suprimento alimentar de nucleotídeos, as vias biossintéticas e de recuperação são tão eficientes que não há necessidade de purinas e pirimidinas da dieta. Nessa seção serão examinados algumas vias biossintéticas dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos em mamíferos.

Os nucleotídeos de purina (AMP e GMP) são sintetizados a partir da ribose−5−fosfato (produto da via pentose−fosfato) para formar 5−fosforribosil−pirofosfato (que é também precursor da histidina):

ATP AMP

Ribose-fosfato pirofosfocinase

Ribose-5-fosfato 5-Fosforibosil-pirofosfato

As subsequentes dez etapas da via requerem como substratos a glutamina, a glicina, o aspartato, o bicarbonato além de grupos formil (−HC=O) doados pelo tetraidrofolato. O produto é a *inosina monofosfato* (IMP), um nucleotídeo cuja base é a purina hipoxantina:

Inosina-monofosfato (IMP)

O IMP é o substrato para duas vias curtas que produzem AMP e GMP. Na síntese de AMP, um grupo amino do aspartato é transferido para a purina; na síntese de GMP, o glutamato é a fonte do grupo amino. As cinases então catalisam as reações de transferência de grupos fosforil para converter os nucleosídeos monofosfatos em difosfatos e, a seguir, em trifosfatos (ATP e GTP).

A Figura 11. 3 indica que a GTP participa da síntese de AMP, enquanto o ATP participa na síntese de GMP. Altas concentrações de ATP, portanto, promovem a produção de GMP, enquanto altas concentrações de GTP promovem a produção de AMP. Essa relação recíproca é um mecanismo de controle da produção dos nucleotídeos adenina e guanina. (Como a maioria dos nucleotídeos destinam-se para a síntese de DNA e RNA, eles são necessários em quantidades aproximadamente iguais). A via que produz AMP e GMP é também regulada por retroinibição em vários pontos, incluindo a primeira etapa, a produção de 5−fosforribosil−pirofosfato a partir da ribose−5−fosfato, que é inibida tanto pelo ADP como pelo GDP.

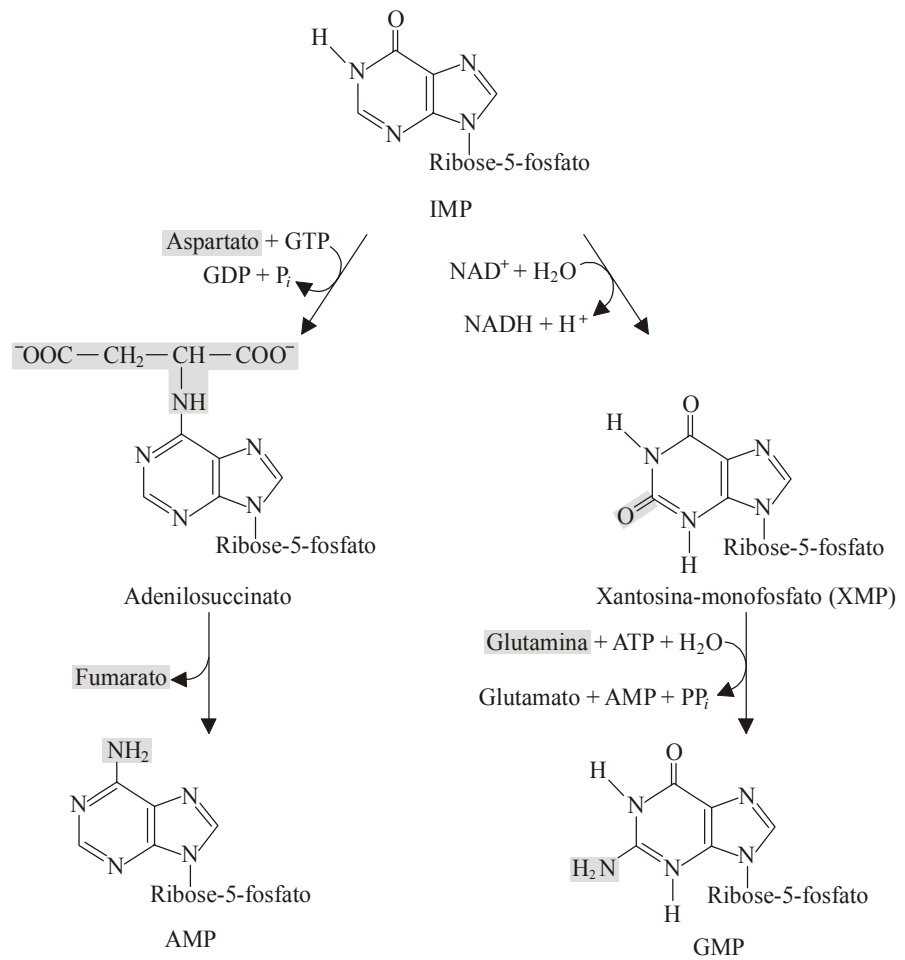
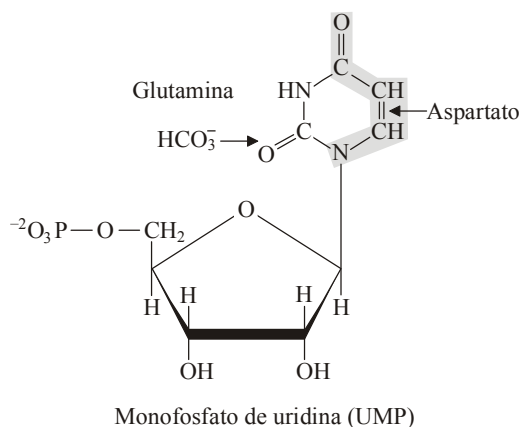
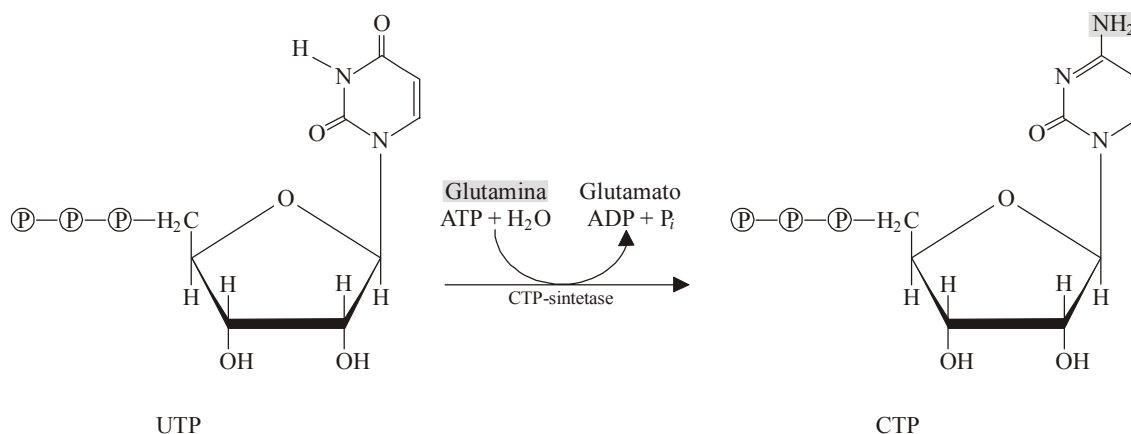



Figura 11.3
Síntese de AMP e GMP a partir do IMP.

Em contraste aos nucleotídeos das purinas, os nucleotídeos das pirimidinas são sintetizados como uma base subsequentemente ligada ao 5−fosforribosil−pirofosfato para formar o nucleotídeo. A via de seis etapas que forma a uridina monofosfato (UMP) necessita glutamina, aspartato e bicarbonato.

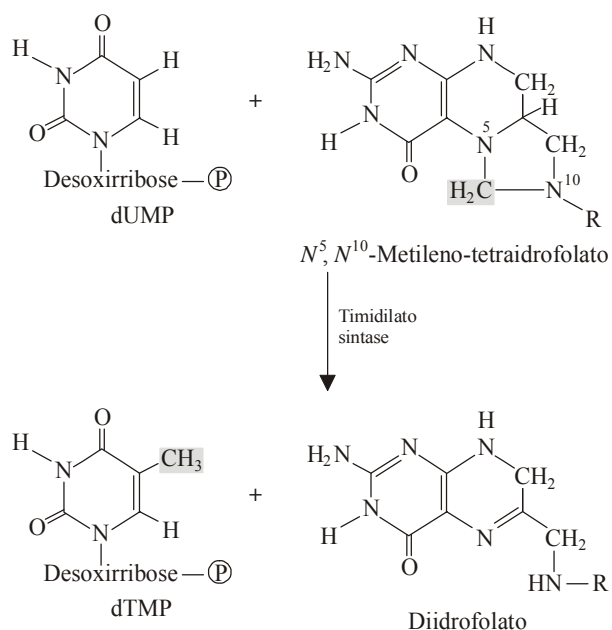
Monofosfato de uridina (UMP)

A UMP é fosforilada para formar UDP e, a seguir, UTP. A CTP−sintetase catalisa a aminação de UTP a CTP, usando a glutamina como doador do grupo amino:

UTP → CTP (CTP-sintetase; Glutamina + ATP + H_2O → Glutamato + ADP + P_i)

A via de síntese de UMP em mamíferos é regulada principalmente por retroinibição pelo UMP, UDP e UTP. O ATP ativa a enzima que catalisa a primeira etapa. Isso ajuda a equlibrar a produção de nucleotídeos purínicos e pirimidínicos.

Até aqui, foram descritas as sínteses de ATP, GTP, CTP e UTP, que são substratos para a síntese de RNA. O DNA é sintetizado a partir de desoxinucleotídeos, que são formados pela redução de ribonucleosídeos difosfatoatos ADP, GDP, CDP e UDP seguido de pela fosforilação de desoxinucleosídeo difosfatos a desoxinucleosídeo trifosfatos.

A dUTP não é usada para a síntese de DNA. Em vez disso, ela é rapidamente convertida em nucleotídeos timina (que previne a incorporação acidental de uracila ao DNA). Inicialmente, a dUTP é hidrolizada a dUMP. A seguir, a timidilato−sintase adiciona um grupo metila ao dUMP para produzir dTMP, usando o metileno−tetraidrofolato como doador de metila.

dUMP + N^5, N^{10}-Metileno-tetraidrofolato

Timidilato sintase

dTMP + Diidrofolato

A reação da serina−hidroximetiltransferase é a principal fonte de metileno−tetraidrofolato.

Na conversão do grupo metileno ($-CH_2-$) a grupo metila ($-CH_3$), a timidilato−sintase converte o co-fator tetraidrofolato à diidrofolato. A enzima diidrofolato−redutase dependente de NADH regenera, então, o co−fator tetraidrofolato reduzido. Finalmente, dTMP é fosforilado para produzir dTTP, substrato para a DNA−polimerase. (*Ver* Capítulo 13).

Como as células cancerígenas sofrem rápida divisão celular, as enzimas da síntese de nucleotídeos, incluindo a timidilato−sintase e a diidrofolato−redutase, são altamente ativas. Os compostos que inibem essas reações são usados na terapia contra o câncer. Por exemplo, o análogo da dUMP, a 5−fluorodesoxiuridilato, inativa a timidilato−sintase. "Antifolatos" como o metotrexato são inibidores competitivos da diidrofolato−redutase pois competem com o diidrofolato pela ligação com a enzima. Em presença de metotrexato, a célula cancerígena não regenera o tetraidrofolato necessário para a produção de dTMP e a célula morre. Muitas células não cancerígenas, cujo crescimento é mais lento, não são tão sensíveis ao efeito do medicamento.

11.5 Catabolismo dos aminoácidos

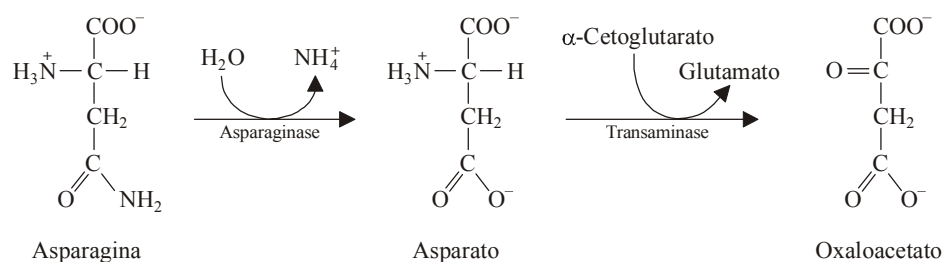
Após remoção dos grupos amino, as cadeias carbonadas dos aminoácidos são degradadas para atender 10-15% das necessidades energéticas do organismo. Segundo a natureza dos produtos de degradação, os aminoácidos podem ser classificados como *glicogênicos* (precursores da gliconeogênese) e/ou *cetogênicos* (produtores de corpos cetônicos)(Tabela 11.3).

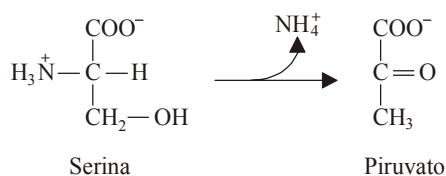
Tabela 11.3 – Aminoácidos glicogênicos e cetogênicos

Glicogênicos	Cetogênicos	Glicogênicos e cetogênicos
Alanina	Leucina	Fenilalanina
Arginina	Lisina	Isoleucina
Asparagina		Tirosina
Aspartato		Treonina
Glicina		Triptofano
Cisteína		
Glutamato		
Glutamina		
Histidina		
Metionina		
Prolina		
Serina		
Valina		

Ao examinar a Tabela 11.3 verifica-se que todos os aminoácidos, exceto leucina e lisina, no mínimo parcialmente, são glicogênicos; todos os aminoácidos não essenciais são glicogênicos; e os esqueletos dos aminoácidos aromáticos são tanto glicogênicos como cetogênicos.

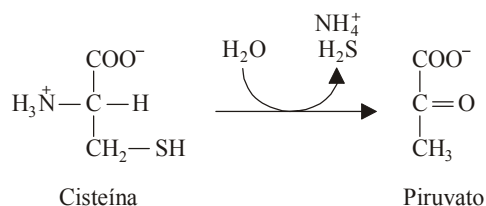
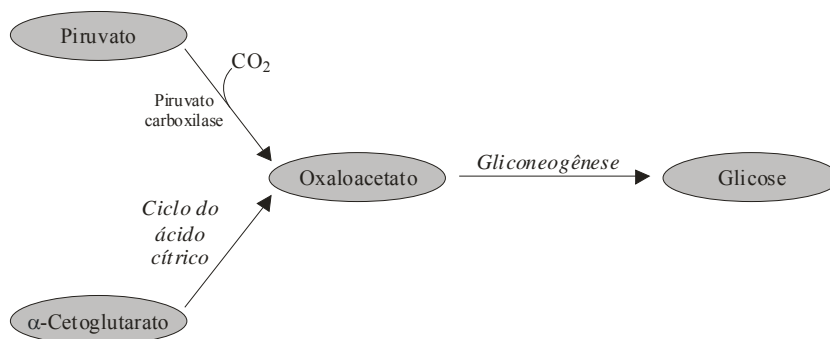
Três aminoácidos são convertidos a substratos glicogênicos por transaminação (o reverso de suas reações biossintéticas): alanina a piruvato, aspartato a oxaloacetato, e glutamato a α–cetoglutarato. O glutamato pode também ser desaminado em reação de oxidação (*ver* Seção 11.1.B). A asparagina forma aspartato por desaminação, que produz, então, oxaloacetato por transaminação.

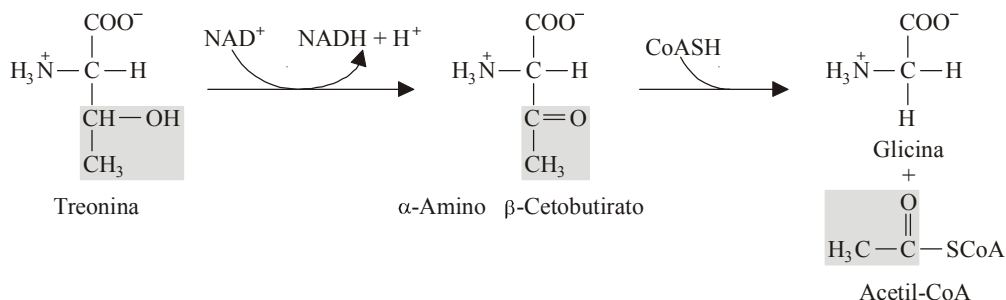
$$\underset{\text{Asparagina}}{H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-C(=O)NH_2} \xrightarrow[\text{Asparaginase}]{H_2O \quad NH_4^+} \underset{\text{Asparato}}{H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-COO^-} \xrightarrow[\text{Transaminase}]{\alpha\text{-Cetoglutarato} \quad \text{Glutamato}} \underset{\text{Oxaloacetato}}{O=C(COO^-)-CH_2-COO^-}$$

Do mesmo modo, a glutamina é desaminada a glutamato e, então, desaminada a α–cetoglutarato. A serina é convertida em piruvato por desaminação:

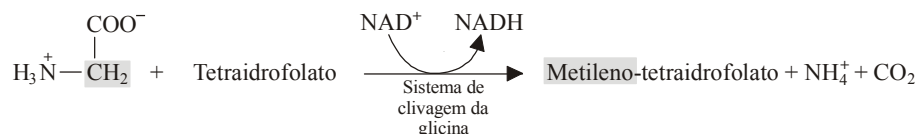
$$\underset{\text{Serina}}{H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-OH} \xrightarrow{NH_4^+} \underset{\text{Piruvato}}{COO^--C(=O)-CH_3}$$

Notar que nessa reação e na conversão da asparagina e glutamina em suas contrapartes ácidas, o grupo amino é liberado como NH_4^+ em lugar de ser transferido para outro composto.

A prolina e a arginina (sintetizadas a partir do glutamato), e a histidina são catabolizadas a glutamato, posteriormente convertido a α−cetoglutarato. A "família" de aminoácidos do glutamato, que inclui glutamina, prolina, arginina e histidina, constitui ao redor de 25% dos aminoácidos da dieta, de tal modo, que suas contribuições potenciais para o metabolismo energético é significante.

A cisteína é convertida a piruvato por um processo que libera amônia também como enxôfre:

Cisteína $\xrightarrow{H_2O \;\rightarrow\; NH_4^+,\ H_2S}$ Piruvato

Os produtos das reações anteriores, piruvato, oxaloacetato e α−cetoglutarato são todos precursores glicogênicos.

A treonina é glicogênica e cetogênica por formar acetil-CoA e glicina:

Treonina $\xrightarrow{NAD^+ \;\rightarrow\; NADH + H^+}$ α-Amino β-Cetobutirato $\xrightarrow{CoASH}$ Glicina + Acetil-CoA

A acetil−CoA é precursora de corpos cetônicos e a glicina é potencialmente glicogênica − se for inicialmente convertida a serina pela ação da serina-hidroximetiltransferase. A principal rota de desdobramento da glicina, entretanto, é catalisada por um complexo multiproteína conhecido como sistema de clivagem da glicina

$$H_3\overset{+}{N}-CH_2(COO^-) + \text{Tetraidrofolato} \xrightarrow[\text{Sistema de clivagem da glicina}]{NAD^+ \rightarrow NADH} \text{Metileno-tetraidrofolato} + NH_4^+ + CO_2$$

As vias de degradação dos demais aminoácidos são mais complexas. Por exemplo, os aminoácidos com cadeias laterais ramificadas – valina, leucina e isoleucina – sofrem transaminação para as suas formas α−cetoácidos e são, então, ligados à coenzima A, em reação de descarboxilação oxidativa. Essa etapa é catalisada pelo complexo da desidrogenase do α−cetoácido de cadeia ramificada, um complexo multienzimático semelhante ao complexo da piruvato−desidrogenase e que compartilha as mesmas subunidades. A deficiência genética da desidrogenase do α−cetoácido de cadeia ramificada causa a doença da urina do xarope de bordo, na qual altas concentrações de α−cetoácidos de cadeia ramificada são excretadas na urina que apresenta um odor característico. A doença é fatal caso não seja tratada com uma dieta de baixo teor de aminoácidos de cadeia ramificada.

As reações iniciais do catabolismo da valina são mostrados na figura 11. . Etapas subsequentes fornecem o intermediário do ciclo do ácido cítrico, a succinil−CoA. A isoleucina e degrada por uma via similar que produz succinil−CoA e acetil−CoA. A degradação da leucina fornece acetil−CoA e o acetoacetato (corpo cetônico). A degradação da lisina segue uma via diferente, mas, também forma acetil−CoA e acetoacetato. A degradação da metionina produz succinil−CoA.

NH_3^+
$H_3C—CH—CH—COO^-$
CH_3
Valina

α-Cetoglutarato
Glutamato

O
$H_3C—CH—C—COO^-$
CH_3

$NAD^+ + CoASH$
$NADH + CO_2$

O
$H_3C—CH—C—SCoA$
CH_3

Q
QH_2

O
$H_3C═CH—C—SCoA$
CH_3

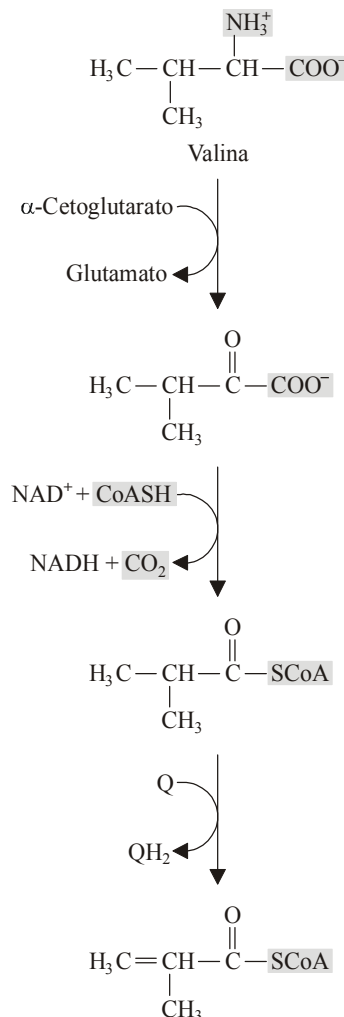



Figura 11.2
Etapas iniciais da degradação da valina.

Finalmente, a clivagem de aminoácidos aromáticos – fenilalanina, tirosina e triptofano – fornece o acetoacetato (corpo cetônico) e também um composto glicogênico (alanina ou fumarato). A primeira reação na via de degradação da fenilalanina é sua hidroxilação a tirosina (porisso a tirosina é não–essencial). A reação usa a tetraidrobiopepterina (derivado da pterina) como co-fator. A tetraidrobiopepterina é oxidada a diidrobiopeptirina em reação da fenilalanina–hidroxilase. O co–fator é subsequentemente reduzido à forma tetraidro por uma enzima NADH–dependente.

Tetraidrobiopterina

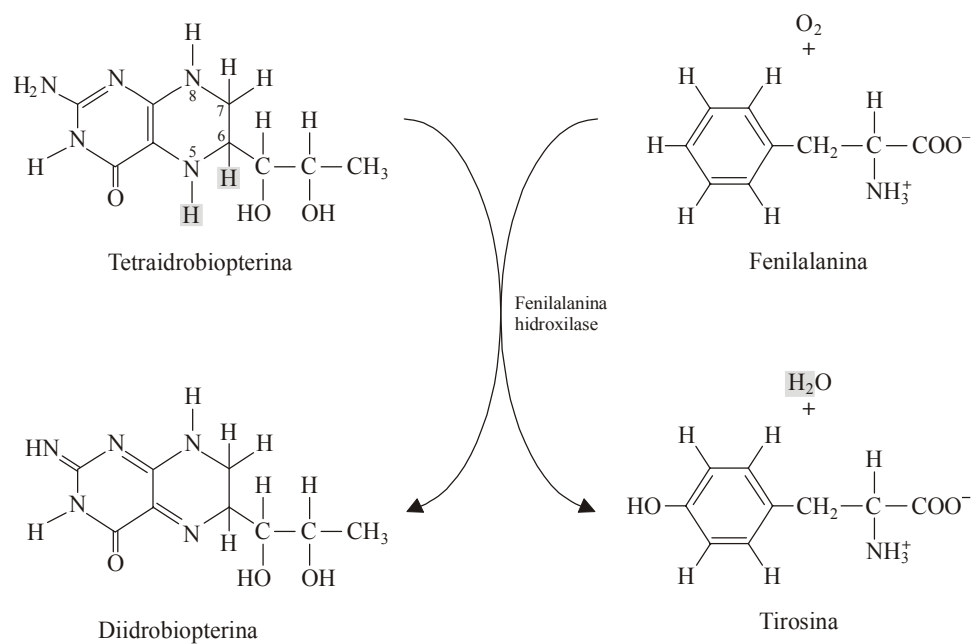
O_2 +

Fenilalanina

Fenilalanina
hidroxilase

Diidrobiopterina

H_2O +

Tirosina

O resumo das interrelações entre o ciclo do ácido cítrico e o metabolismo dos aminoácidos é mostrada na Figura 11.3.

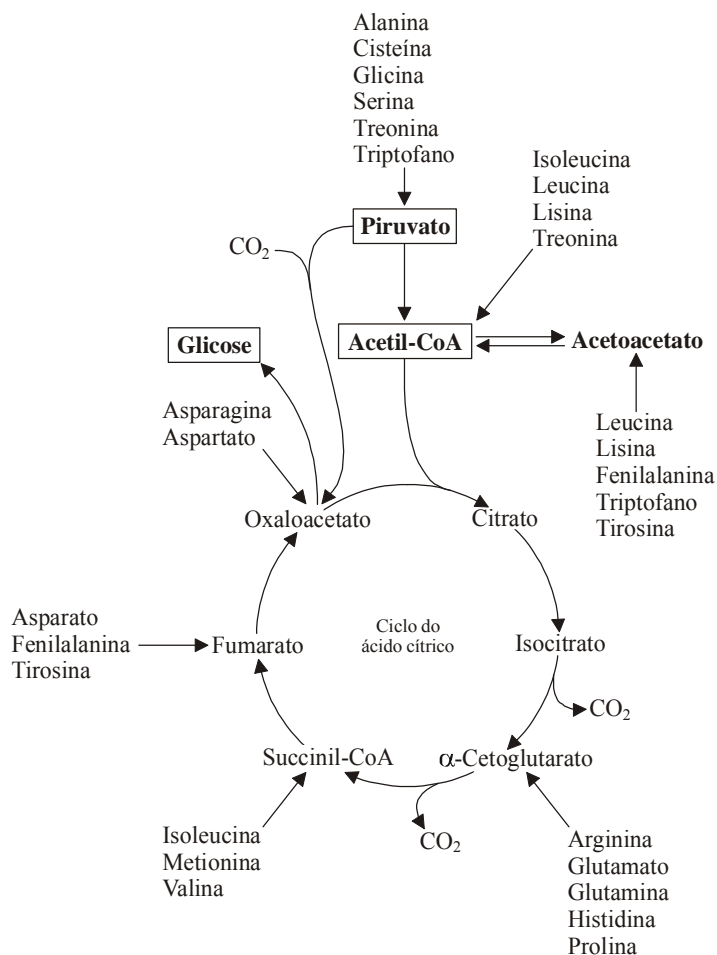



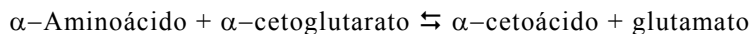
Figura 11.3
Resumo das interrelações entre o ciclo do ácido cítrico e o metabolismo dos aminoácidos. Conversão dos esqueletos carbonados dos aminoácidos em piruvato, acetoacetato, acetil-CoA, ou intermediários do ciclo do ácido cítrico para posterior catabolismo.

11.6 Excreção do nitrogênio

Os aminoácidos são degradados no fígado e, em menor grau, no rim. A contribuição do músculo esquelético é mínima. No fígado, os grupos amino dos aminoácidos são removidos em processo envolvendo principalmente dois tipos de reações: *transaminação* e *desaminação oxidativa*.

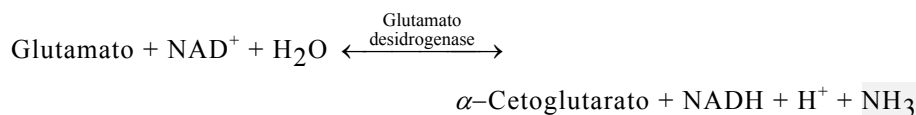
A. Transaminação

A reação de transaminação transfere reversivelmente o grupo α–amino de um aminoácido para o α–cetoglutarado em presença de *transaminases* (amino–transferases)(*ver* Seção 11.2)

$$\alpha\text{–Aminoácido} + \alpha\text{–cetoglutarato} \leftrightarrows \alpha\text{–cetoácido} + \text{glutamato}$$

A treonina, arginina, lisina e prolina não sofrem transaminação com o α–cetoglutarato.

B. Desaminação oxidativa

A *glutamato–desidrogenase* catalisa a remoção do grupo amino como amônia livre a partir do glutamato proveniente, sobretudo, das reações de transaminação (*ver* Seção 11.1.B). No fígado, a enzima está localizada na matriz mitocondrial e emprega o NAD^+ ou $NADP^+$ como aceptor de elétrons:

$$\text{Glutamato} + NAD^+ + H_2O \xleftrightarrow{\text{Glutamato desidrogenase}} \alpha\text{–Cetoglutarato} + NADH + H^+ + NH_3$$

C. L-Aminoácido-oxidases

Pequenas quantidades de amônia são formadas pela ação das *L–aminoácido–oxidases* encontradas nos peroxissomas do fígado e rins. O aceptor imediato de elétrons é a FMN (flavina mononucleotídeo). A $FMNH_2$ produzida reage com o O_2 para formar H_2O_2.

D. Serina e treonina-desidratases

A serina e a treonina não são substratos para as reações de transaminações. Seus grupos amino são removidos por enzimas hepáticas que necessitam piridoxal–fosfato: a *serina–desidratase* e *treonina–desidratase*. O esqueleto carbonado produzidos nas reações são o piruvato e o α–cetoglutarato, respectivamente.

E. Urease bacteriana

Cerca de 25% da amônia hepática é produzida pela ação de ureases bacterianas intestinais sobre a uréia que difunde do sangue para o lúmen intestinal. A amônia liberada volta ao fígado pela circulação.

11.7 Destino da amônia

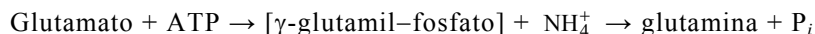
Os íons amônio formados por transaminação/desaminação oxidativa e por outras reações, são exportados dos tecidos extra–hepáticos para o fígado para formar uréia, um composto não–tóxico.

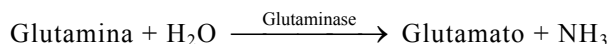
Os efeitos tóxicos dos íons amônio são provocados pela adição dos mesmos ao α–cetoglutarato para formar glutamato (ação reversa da glutamato–desidrogenase). Como o desvio do α–cetoglutarato interfere no funcionamento normal do ciclo do ácido cítrico, ocorre a diminuição da oxidação de acetil–CoA derivado da glicose, o principal combustível para o cérebro e, assim, elevar a formação de corpos cetônicos. Como o α –cetoglutarato é também intermediário em outros processos sua depleção altera o metabolismo normal da célula. Outros fatores pouco entendidos também atuam para a toxicidade de íons amônio para o cérebro.

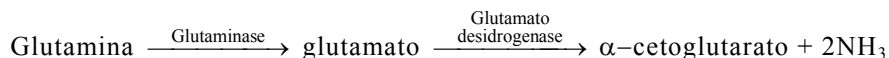
São dois os mecanismos para o transporte de íons amônio dos tecidos extra–hepáticos para o fígado ou para os rins: a *síntese de glutamina* e o *ciclo glicose–alanina.*

A. Incorporação da amônia ao glutamato para formar glutamina

A maioria dos tecidos sintetizam glutamina a partir do glutamato como forma de armazenamento temporário não–tóxico e transporte de amônia para o fígado ou para os rins. (*Ver* Seção 11.1.B).

$$\text{Glutamato} + \text{ATP} \rightarrow [\gamma\text{-glutamil–fosfato}] + NH_4^+ \rightarrow \text{glutamina} + P_i$$

A glutamina é hidrolizada no fígado e rim, a glutamato e amônia pela ação da enzima *glutaminase:*

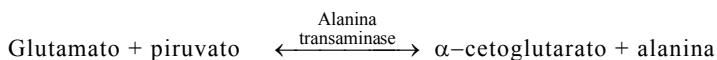
$$\text{Glutamina} + H_2O \xrightarrow{\text{Glutaminase}} \text{Glutamato} + NH_3$$

No fígado, a amônia liberada pela hidrólise é utilizada na síntese de uréia. No rim, além da atividade da glutaminase para a produção de glutamato, ocorre a desaminação oxidativa desse último a α–cetoglutarato pela ação da *glutamato–desidrogenase*. Portanto, duas moléculas de amônia são excretadas na urina para cada glutamina transformada em α-cetoglutarato.

$$\text{Glutamina} \xrightarrow{\text{Glutaminase}} \text{glutamato} \xrightarrow[\text{desidrogenase}]{\text{Glutamato}} \alpha\text{–cetoglutarato} + 2NH_3$$

Nos túbulos renais, a amônia é protonada a íons amônio (NH_4^+), que atuam na neutralização de ácidos metabólicos na urina.

A glutamina também exerce importante papel na biossíntese de hexosaminas, aminoácidos, purinas e pirimidinas.

B. Ciclo glicose–alanina

Os íons amônio produzidos pela degradação de aminoácidos nos músculos e outros tecidos, são também transportados ao fígado como alanina utilizando o *ciclo da glicose–alanina*. No músculo, os íons amônio reagem com o α–cetoglutarato para formar glutamato pela ação da *glutamato–desidrogenase*. O glutamato transfere o seu grupo α–amino ao piruvato em presença da *alanina–transaminase*:

$$\text{Glutamato} + \text{piruvato} \xleftrightarrow[\text{transaminase}]{\text{Alanina}} \alpha\text{–cetoglutarato} + \text{alanina}$$

A alanina produzida é transportada pelo sangue ao fígado onde transfere o seu grupo amino para o α–cetoglutarato por meio da *alanina–transaminase*, formando glutamato que, por desaminação, produz α–cetoglutarato e amônia pela *glutamato–desidrogenase*.

11.8 Síntese da uréia (Ciclo da Uréia)

A uréia – um composto neutro, não–tóxico, altamente solúvel e excretado pela urina – é o principal produto de excreção do excesso de nitrogênio proveniente do catabolismo dos aminoácidos no homem. Com ingestão normal de proteínas, a uréia constitui 80% dos produtos nitrogenados da urina. São ainda encontrados na urina: ácido úrico, creatinina, íons amônio e outras formas menores de compostos nitrogenados. A síntese de uréia é realizada no fígado por cinco reações (duas mitocondriais e três citosólicas) do *ciclo da uréia* (ciclo de Krebs–Henseleit) (Figura 11.4).

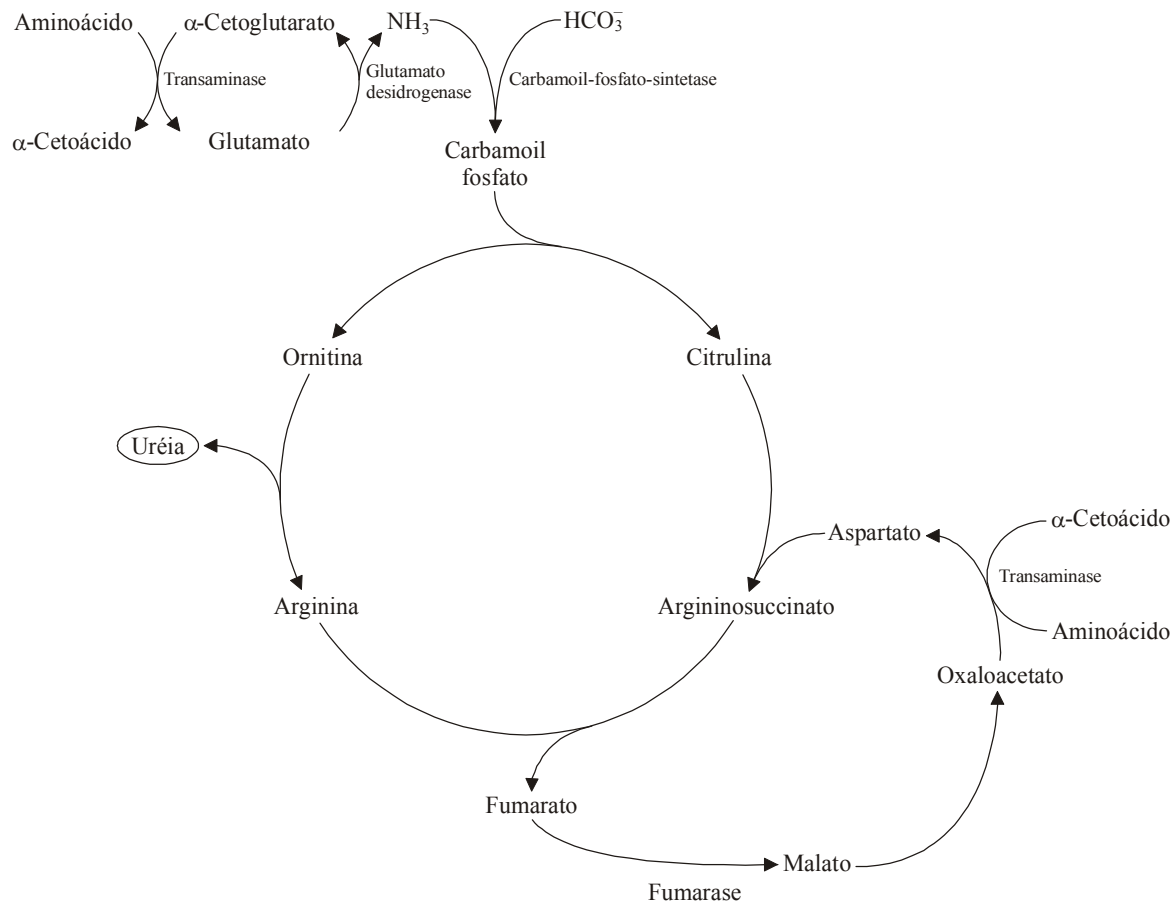



Figura 11.4
Ciclo da uréia. As enzimas que participam do ciclo são: (1) carbamoil-fosfato-sintetase, (2) ornitina-transcarbamoilase, (3) arginino-succinato-sintetase, (4) arginino-succinase e (5) arginase. As enzimas (1) e (2) são mitocondriais e as enzimas 3-5 são citosólicas.

1. Carbamoil–fosfato–sintetase I. O substrato inicial para o ciclo da uréia é uma molécula "ativada" produzida pela condensação do bicarbonato e íon amônio, catalisada pela *carbamoil–fosfato–sintetase I*. A reação consome dois ATP e produz *carbamoil–fosfato* (composto de alta energia). Tecnicamente a reação não faz parte do ciclo da uréia.

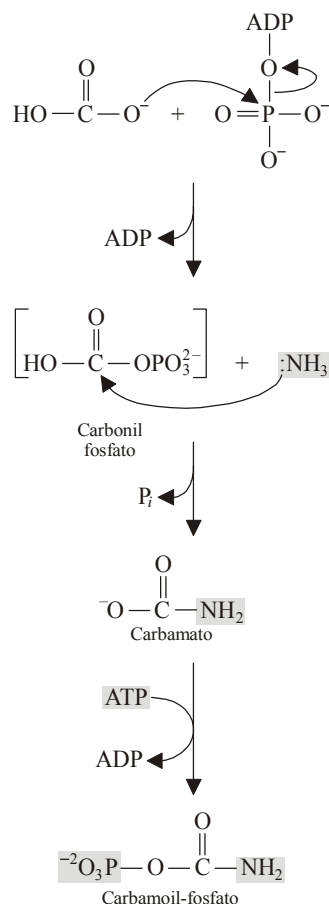
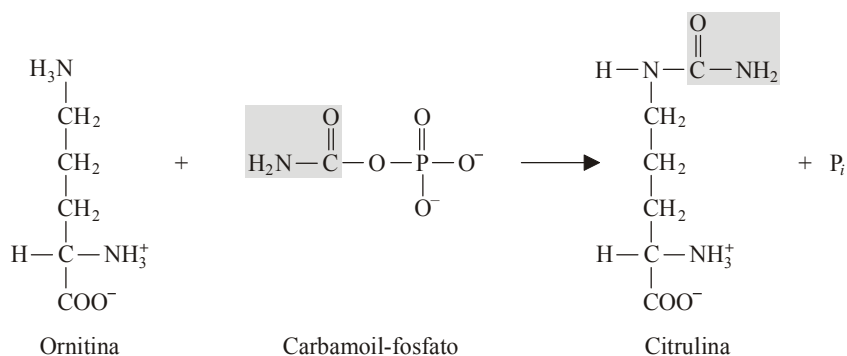
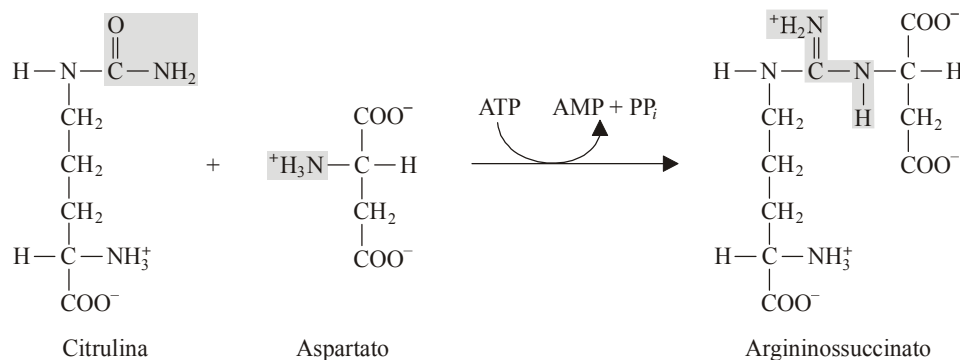



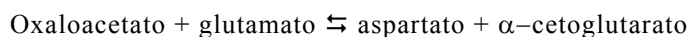
Figura 11.5
Síntese da carbamoil–fosfato catalisada pela carbamoil–fosfato–sintetase I. O ATP ativa o fosfato para formar a carbonila–fosfato. O NH_3 reage com a carbamila–fosfato para formar carbamato. A incorporação de um segundo grupo fosforil forma carbamoil-fosfato e ADP.

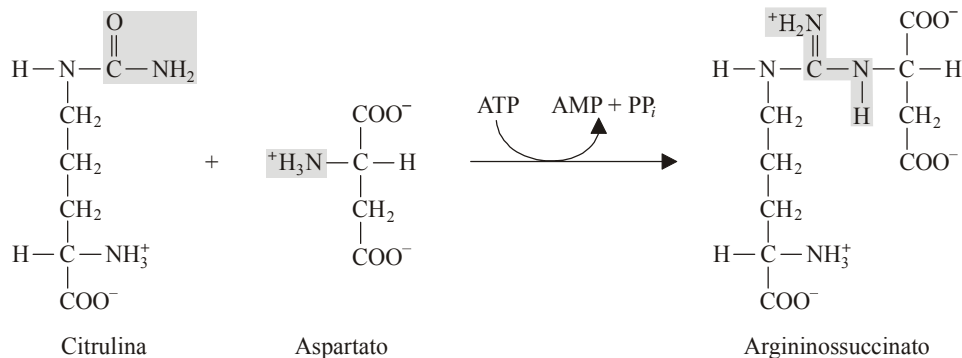
A enzima requer *N–acetilglutamato* como efetor alostérico positivo. Essa é a etapa limitante de síntese da uréia.

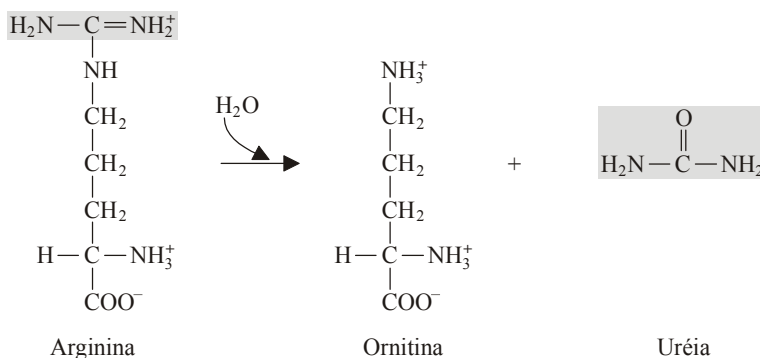
2. Ornitina–transcarbamoilase. A reação seguinte do ciclo é a transferência do grupo carbamoil (NH_2–CO–), oriundo do carbamoil–fosfato, para a ornitina para produzir *citrulina*. A reação ocorre na matriz mitocondrial pela ação da *ornitina–transcarbamoilase*. A citrulina é transferida para o citosol por uma proteína transportadora específica. As reações seguintes do ciclo da uréia tem lugar no citosol.

Ornitina + Carbamoil-fosfato → Citrulina + P_i

3. **Arginino–succinato–sintetase.** O segundo grupo amino da uréia é doado pelo aspartato. A condensação necessita ATP e é catalisada pela *arginino–succinato–sintetase.* Os produtos formados são: *arginino–succinato*, AMP e pirofosfato (PP_i). O pirofosfato (forte inibidor da reação) é clivado a ortofosfato ($2P_i$). A clivagem supre energia adicional para as reações sintéticas, além de remover o efeito inibidor do pirofosfato.

Citrulina + Aspartato → (ATP → AMP + PP_i) Argininossuccinato

A principal fonte de aspartato é a transaminação do glutamato com o oxaloacetato:

Oxaloacetato + glutamato ⇆ aspartato + α–cetoglutarato

4. **Arginino–succinase.** A *arginino–succinase* (*argininossuccinato–liase*) catalisa a clivagem do arginino-succinato para fornecer *arginina* e *fumarato*. A síntese do fumarato *une* o ciclo da uréia ao ciclo da ácido cítrico. O fumarato também pode ser reconvertido a aspartato.

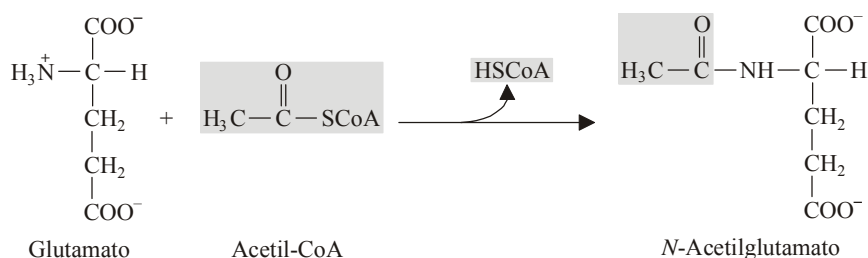
Citrulina + Aspartato $\xrightarrow{ATP \rightarrow AMP + PP_i}$ Argininossuccinato

5. Arginase. Somente o fígado possui a enzima *arginase* que catalisa a hidrólise da arginina produzindo *uréia* e regenerando a *ornitina*. A ornitina retorna para a mitocôndria onde condensa novamente com a carbamoil–fosfato para reiniciar o ciclo. Através da corrente sangüínea, a uréia é transportada até os rins, onde é excretada pela urina.

Arginina $\xrightarrow{H_2O}$ Ornitina + Uréia

A uréia é proveniente, portanto, de dois grupos amino, um da amônia e outro do aspartato, e de um carbono fornecido pelo bicarbonato.

A síntese de uma molécula de uréia requer quatro ATP. Dois para a síntese de carbamoil–fosfato e um para a formação de argininossuccinato; esse último é clivado em AMP e pirofosfato (PP_i) cuja hidrólise fornece dois ortofosfatos ($2P_i$). Duas moléculas de ATP são consumidas para gerar o ATP a partir de AMP. Mesmo assim, o ciclo da uréia rende 2 ATP por meio de reações auxiliares. A reação da glutamato–desidrogenase produz NADH (ou NADPH), e a conversão de malato a oxaloacetato pela malato–desidrogenase também gera NADH (equivalente a 3 ATP). Total das duas reações: 6 ATP. O rendimento líquido é 2 ATP por molécula de uréia.

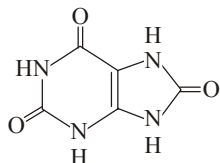
A. Regulação do ciclo da uréia

A carbamoil–fosfato–sintetase I mitocondrial é ativada alostericamente pelo *N–acetilglutamato,* produzido a partir do glutamato e de acetil–CoA em reação catalisada pela N–acetilglutamato–sintase, que é ativada pela arginina.

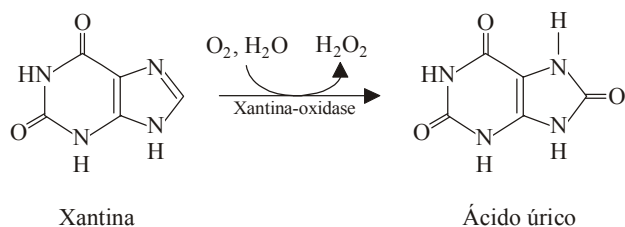
Glutamato + Acetil-CoA → (HSCoA) *N*-Acetilglutamato

Quando a quebra metabólica de aminoácidos aumenta, a concentração do glutamato eleva e estimula a síntese do N–acetilglutamato que, por sua vez, aumenta a síntese de uréia.

As demais enzimas do ciclo da uréia são reguladas pela concentração de seus substratos. São modificadas por variações no consumo de proteínas na dieta. Após alguns dias de alterações no conteúdo protéico da dieta, ocorrem mudanças na produção de uréia. Vários hormônios (exemplo, glucagon e glicocorticóides) estão envolvidos no controle da velocidade de síntese das enzimas do ciclo.

11.9 Excreção de nitrogênio como ácido úrico

A uréia é uma substância relativamente não-tóxica e facilmente transportada pelo sangue até os rins. Entretanto, a molécula de uréia necessita grandes quantidades de água para a sua excreção eficiente. Vertebrados voadores como os pássaros e para os répteis adaptados a ambientes áridos, isso é um sério problema. Esses organismos produzem ácido úrico como produto de excreção de nitrogênio que é eliminado como uma mistura semifluída.

Ácido úrico

O ácido úrico é também o produto final da degradação de purina nucleotídeos em primatas e alguns outros animais. As moléculas de nucleotídeos são desdobradas por nucleotidases (que removem os grupos fosfato para formar nucleosídeos) e desaminases (que removem os substituintes amínicos do anel). A reação final do catabolismo de purina nucleotídeos é catalisada pela *xantina–oxidase* para formar ácido úrico:

Xantina → (O_2, H_2O; H_2O_2; Xantina-oxidase) Ácido úrico

O excesso de ácido úrico, que é pouco solúvel em meio aquoso, resulta em deposição de cristais de urato de sódio na forma de cálculos renais. O ácido úrico também pode precipitar nas articulações, principalmente, dos joelhos e dos dedos do pé, em uma condição clínica dolorosa conhecida como *gota*. O excesso de ácido úrico pode ser tratado por um análogo de purina que bloqueia a atividade da xantina−oxidase. Os intermediários anteriores do catabolismo da purinas, que são mais solúveis que o ácido úrico, são então excretados.

As pirimidinas nucleotídeos, de modo semelhante as purinas, sofrem desaminação e remoção dos grupos fosfato e ribose. Os produtos das reações são muitas vezes utilizados nas vias de recuperação para regenerar nucleotídeos. Entretanto, de modo diferente das purinas, as bases pirimidínicas (uracila e timina) podem ser ainda degradadas como derivados de CoA. Consequentemente, o catabolismo das pirimidinas celulares contribui levemente para o *pool* de combustíveis metabólicos, enquanto o excesso de purinas são excretados.

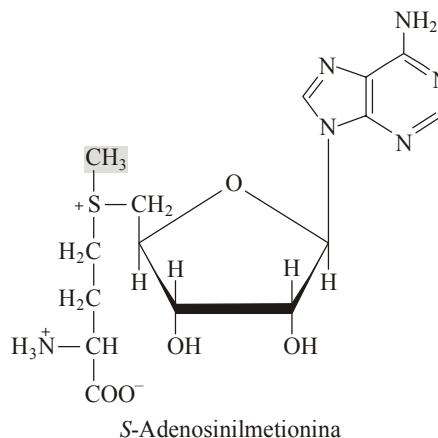
11.10 Moléculas derivadas dos aminoácidos

Os aminoácidos além de servirem como blocos construtores de polipeptídeos, são precursores de muitas biomoléculas de grande importância fisiológica. Na discussão seguinte, serão abordadas a síntese de várias dessas moléculas, por exemplo, neurotransmissores, glutationa, alcalóides, porfirinas e nucleotídeos. Como esses processos envolvem a transferência de carbonos, a seção inicia com uma descrição do metabolismo de monocarbonos.

Grupamentos de uma unidade de carbono (em vários estágios de oxidação) são transferidos de um composto para outro em fases importantes do metabolismo como a síntese e destoxificação. Dois são os carreadores de compostos monocarbônicos: a *S*-adenosilmetionina e o tetraidrofolato.

A. S−adenosilmetionina (SAM)

A *S*−adenosilmetionina é doadora de grupos metila ($-CH_3$) de um intermediário a outro em várias reações de síntese.

S-Adenosinilmetionina

É obtido pela transferência do grupo adenosil do ATP para a metionina:

$$\text{Metionina} + \text{ATP} \longrightarrow S\text{−Adenosilmetionina} + P_i + PP_i$$

O grupo sulfônio da *S*–adenosilmetionina reage com aceptores nucleófilos e doa grupos metila para as reações de síntese. Por exemplo, a conversão do hormônio noradrenalina em adrenalina:

$$(HO)_2C_6H_3-CH(OH)-CH_2-\overset{+}{N}H_3 \longrightarrow (HO)_2C_6H_3-CH(OH)-CH_2-\overset{+}{N}H_2-CH_3$$

Noradrenalina → Adrenalina

A *S*-adenosilmetionina atua como doador de metila em reações de metilação de fosfolipídeos, proteínas, DNA e RNA (Tabela 11.4).

Tabela 11.4 – Transferência de grupos metila a partir da S-adenosilmetionina.

Aceptor metílico	Produto metilado
Ácido guanidinoacético	Creatina
Fosfatidiletanolamina (3 metilas)	Fosfatidilcolina
Nicotinamida	*N*–Metilnicotinamida
Noradrenalina	Adrenalina
Carnosina	Anserina
Ácido γ–aminobutírico (GABA)	Carnitina
RNA de transferência e ribossômico	RNA metilado
DNA	DNA metilado

B. Tetraidrofolato (THF)

O tetraidrofolato (THF) co–fator derivado do *folato,* atua como um carregador de unidades de um carbono (C_1) em várias reações do metabolismo dos aminoácidos e dos nucleotídeos. Os mamíferos *não* sintetizam folato (a forma oxidada do tetraidrofolato) e devem obtê-lo a partir de alimentos. As exigências por folato aumenta durante as primeiras semanas de gravidez, quando o sistema nervoso fetal começa a se desenvolver. Suprimentos de folato parecem prevenir certos defeitos do tubo neural como a spina bífida, na qual o cordão espinhal permanece exposto.

(a)

2-Amino-4-oxo 6-metilpterina | *p*-Aminobenzoato | Glutamatos (n=1-6)

(b)

N^5,N^{10}-Metilenotetraidrofolato

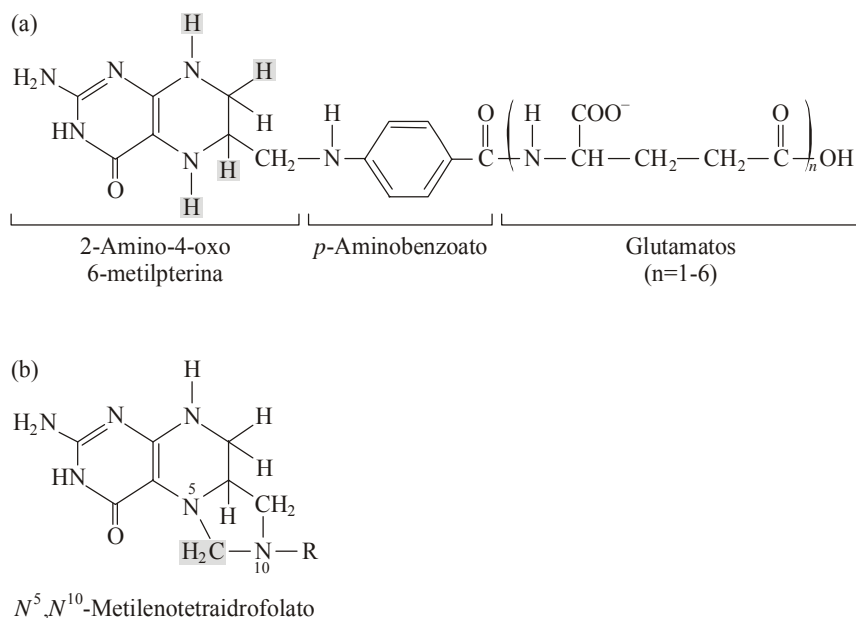



Figura 11.2
Tetraidrofolato (THF). (a) O co–fator consiste de um derivado da pterina, um resíduo de *p*–aminobenzoato e mais de seis resóduos de glutamato. É a forma reduzida da vitamina folato. Os quatro átomos de H da forma tetraidro estão sombreados. (b) Na conversão da serina em glicina, um grupo metileno (sombreado) liga-se ao N5 e N10 do tetraidrofolato. O tetraidrofolato pode carregar unidades de um carbono de diferentes estados de oxidação. Por exemplo, um grupo metila ligado ao N5 e um grupo formil (–HCO) ligado ao N5 ou N10.

O tetraidrofolato aceita unidades de um carbono de vários aminoácidos ou de seus metabólitos. Um exemplo proeminente é a remoção do grupo hidroximetil da serina com a consequente formação de glicina. Além da serina, outros intermediários doam unidades de um carbono ao tetraidrofolato (Tabela 11.5).

Tabela 11.5 – Doadores de unidades de um carbono (C_1) ao tetraidrofolato (THF)

Doador	Mecanismo
Serina	Conversão em glicina com transferência de metileno
Formaldeído	Combinação direta
Metionina	Oxidação da metila; transferida como –HC=O
Colina	Conversão em betaína; os grupos metila são oxidados e transferidos
Sarcosina	Oxidação da metila; transferida como $H_2C=O$
Glicina	Oxidação a formato, que é transferido
Ácido δ–aminolevulínico	Oxidação a formato, que é transferido
Triptofano	Oxidação à *N*-formilquinurinina, doador de formato
Formato	Combinação direta
Histidina	Formação do ácido formiminoglutâmico e transferência de formimidoil (-HC=NH)

C. Neurotransmissores

Na terminação do nervo, a chegada do impulso nervoso influencia uma segunda célula, como, por exemplo, outro nervo, músculo esquelético, músculo involuntário ou glândula secretória. A junção entre o terminal do nervo e a célula seguinte é a *sinapse*. A chegada do potencial de ação na sinapse resulta na liberação de uma substância transmissora pela membrana pré-sinaptica que atravessa a lacuna (espaço entre as células) e libera o sinal ao se ligar a um receptor específico presente na membrana pós–sináptica. Os *neurotransmissores* são moléculas pequenas que comunicam os impulsos nervosos através da maioria das sinapses. Podem ser excitatórios ou inibitórios.

Muitos neurotransmissores são aminoácidos ou aminas primárias ou secundárias derivadas de aminoácidos (aminas biogênicas) (Tabela 11.6). Nessa seção, será realizada uma breve discussão de aminoácidos, aminas biogências e do óxido nítrico como neurotransmissores.

Tabela 11.6 – Neurotransmissores aminoácidos e aminas.

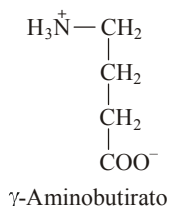
Aminoácidos	Aminas
Glicina	Noradrenalina (norepinefrina)
Glutamato	Adrenalina (epinefrina)
Ácido γ-aminobutírico (GABA)	Dopamina
	Serotonina
	Histamina

1. Glicina. É um neurotransmissor inibitório para a medula espinhal e grande parte do tronco cerebral onde bloqueia o impulso que migra através do cordão medular para os neurônios motores, para estimular o músculo esquelético. As terminações nervosas pré-sinápticas apresentam uma sistema de transporte para remover a glicina da sinapse. A inibição surge pelo aumento da condutância de Cl. A estricnina provoca rigidez e convulsões ao se ligar aos receptores de glicina. A apamina, a amida polipeptídica de 18 resíduos de aminoácidos do veneno de abelha, funciona de forma semelhante.

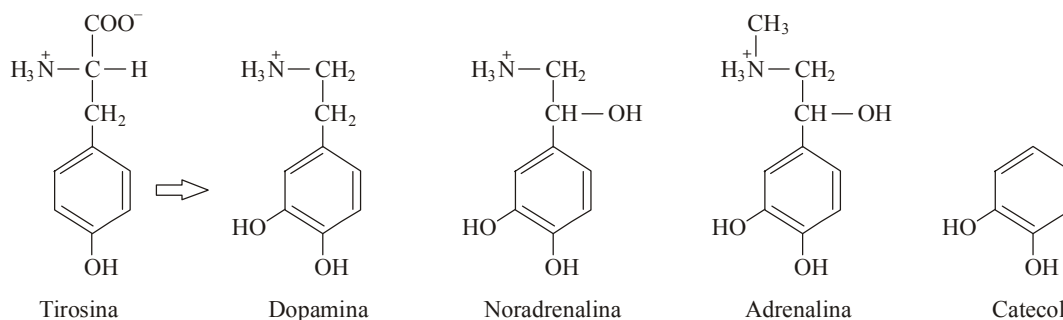
2. Glutamato. É o neurotransmissor excitatório amplamente distribuído pelo sistema nervoso central. O glutamato é reciclado nos neurônios e nas células gliais. A célula glial transforma o glutamato em glutamina, que então difunde novamente para o neurônio. A glutaminase mitocondrial no neurônio produz novamente o glutamato, para reutilização. A ativação de seu receptor (*N*–metil–D–aspartato, NMDA) aumenta a sensibilidade aos estímulos de outros neurotransmissores. O álcool inibe a influencia do glutamato, e deste modo diminui a sensibilidade aos estímulos. O glutamato monossódico é suspeito de contribuir para alguns distúrbios psicológicos, apesar desse fato não ter sido ainda comprovado.

3. Ácido γ–aminobutírico (GABA). Atua como neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central. A ligação do GABA ao seu receptor aumeta a permeabilidade da membrana da célula nervosa para os íons cloretos (Os benzodiazepínicos, uma classe de tranqüilizantes que reduzem a ansiedade e causam relaxamento muscular, provocam uma potencialização da resposta ao GABA aumentando a condutância da membrana para cloretos).

$$H_3\overset{+}{N}-CH_2-CH_2-CH_2-COO^-$$

γ-Aminobutirato

Existem dois tipos de receptores deste neurotransmissor: os GABA–α e os GABA–β, dos quais apenas o primeiro é estimulado pelo álcool, benzodiazepinas e barbituricos do que resulta uma diminuição de sensibilidade para outros estímulos. O efeito ansiolítico do álcool é mediado pelos receptores de GABA

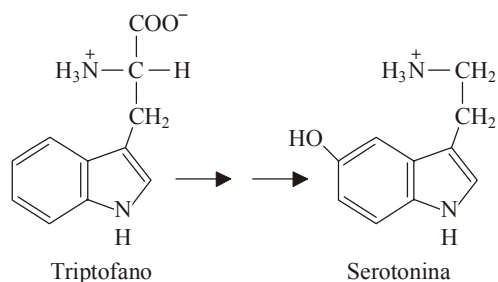
4. Catecolaminas. Compreendem a dopamina, noradrenalina (norepinefrina) e adrenalina (epinefrina), e são derivadas do aminoácido tirosina. A dopamina e noradrenalina são usadas no cérebro como neurotransmissores excitatórios. Fora do sistema nervoso, a noradrenalina e a adrenalina são liberadas principalmente pela medula adrenal e pelo sistema nervoso periférico. Como ambas regulam vários aspectos do metabolismo, elas são consideradas hormônios.

Tirosina ⇨ Dopamina — Noradrenalina — Adrenalina — Catecol

A secreção da *adrenalina* em resposta ao estresse, trauma, exercício vioroso ou hipoglicemia causa a rápida mobilização de energia armazenada, ou seja, glicose do fígado e ácidos graxos do tecido adiposo. A reação na qual a noradrenalina é metilada para formar adrenalina é

mediada pela enzima feniletanolamina–*N*–metiltransferase (PNMT). Apesar da enzima ocorrer predominatemente nas células cromafínicas da medula adrenal ela também é encontrada em certas porções do cérebro onde a adrenalina funciona como um neurotransmissor. Evidências recentes indicam que a adrenalina e a noradrenalina estão presentes em vários outros órgãos (exemplo, fígado, coração e pulmão)

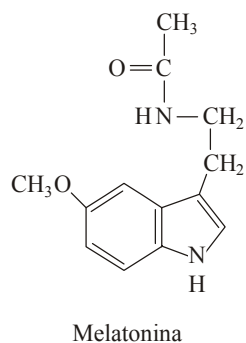
5. Serotonina (5-hidroxitriptamina). A serotonina é um poderoso vasoconstritor e estimulador da contração do músculo liso e inibidor da secreção gástrica. É encontrada no cérebro, intestino, mastócitos e plaquetas, bem como em tumores carcinóides. No cérebro atua, aparentemente, como um agente neuro-hormonal que aumenta a atividade do nervo. A serotonina é sintetizada a partir do triptofano.

COO^- $H_3\overset{+}{N}—C—H$ CH_2 N H → → HO $H_3\overset{+}{N}—CH_2$ CH_2 N H

Triptofano Serotonina

Baixos níveis de serotonina no cérebro estão relacionados depressão, agressão e hiperatividade. O efeito antidepressivo de medicamentos como o Prozac® resulta de sua capacidade de aumentar os teores de serotonina pelo bloqueio da reabsorção do neurotransmissor liberado.

A serotonina é tambem convertida em *melatonina* (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) formada na glândula pineal e retina. Sua concentração é baixa durante o dia e alta no escuro. Como a melatonina parece influenciar a síntese de alguns neurotransmissores que controlam o ritmo circadiano, ela tem sido usada para o tratamento de distúrbios do sono e do jet lag.

CH_3 O=C HN—CH_2 CH_2 CH_3O N H

Melatonina

6. Histamina. É uma amina produzida por muitos tecidos do organismo, e tem efeitos fisiológicos complexos. É um mediador de reações alérgicas e inflamatórias, um estimulador da produção gástrica de ácido e um neurotransmissor em diversas áreas do cérebro. A histamina é formada pela descarboxilação da L–histidina em uma reação catalisada pela histidina–descarboxilase, uma enzima que necessita de piridoxal–5'–fosfato.

7. Óxido nítrico. É um gás altamente reativo. Além de muitas funções do óxido nítrico (regulação da pressão sangüínea, inibição da coagulação sangüínea e a destruição de células estranhas, lesadas ou cancerosas pelos macrófagos) ele também atua como um neurotransmissor. O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da arginina pela *óxido–nítrico–sintase* (NOS) sendo produzido em muitas áreas do cérebro onde sua função está relacionada com a função neurotransmissora do glutamato. Quando o glutamato é liberado de um neurônio e se liga a certas classes de receptores do glutamato, um fluxo de Ca^{2+} através de uma membrana pós-sinaptica é disparado, o que estimula a síntese da NOS. Uma vez sintetizado, o óxido nítrico difunde de sua célula de origem para a célula pré-sináptica, onde os sinais promovem a liberação do glutamato. Em outras palavras, o NO atua como um neurotransmissor retrógado; ou seja, ele promove um ciclo no qual o glutamato é liberado do neurônio pré-sinaptico e então liga-se e promove potenciais de ação no neurônio pós–sináptico. Esse mecanismo potenciador exerce importante papel no aprendizado e na formação da memória, também como em outras funções no cérebro dos mamíferos.

D. Glutationa (GSH)

A glutationa (γ–glutamilcisteinilglicina) é tripeptídeo contendo uma sulfidrila. A glutationa (GSH) está envolvida na síntese do DNA e RNA, de certos eicosanóides e de outras biomoléculas. Em muitos desses processos, a GSH atua como agente redutor que mantêm os grupos sulfidrilicos das enzimas e outras moléculas no estado reduzido. Além de proteger as células das radiações, da toxicidade do oxigênio e de toxinas ambientais, a GSH também promove o transporte de aminoácidos (ciclo γ–glutamil).

A GSH contribui para a proteção das células das toxinas ambientais. A GSH reage com várias moléculas estranhas para formar conjugados de GSH. A ligação desses substratos com a GSH, prepara-os para a excreção, que pode ser espontânea ou catalisada pelas *glutationa–S–transferases* (também conhecidas como ligandinas). Antes da excreção urinária, os GSH conjugados são geralmente convertidos em ácidos mercaptúricos.

E. Biossíntese do grupo heme

O heme, uma das moléculas mais complexas sintetizadas pelos mamíferos, tem um anel porfirínico contendo ferro. O heme é um componente estrutural da hemoglobina, mioglobina e citocromos. A via biossintética do heme é predominante no fígado, medula óssea, células intestinais e em reticulócitos (células precursores de eritrócitos contendo núcleo).

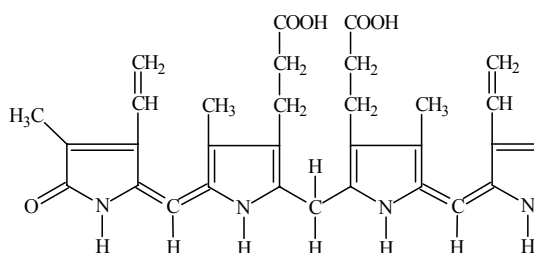
Na primeira etapa da síntese, a glicina se condensa com succinil-CoA, formando o δ-aminolevulinato (ALA) em reação é catalisada pela ALA–sintase que necessita de fosfato de piridoxal. É a etapa comprometida da biossíntese de porfirinas. A ALA–sintase, uma enzima mitocondrial, é inibida alostericamente pela *hemina* um derivado do heme contendo Fe^{+}. Na etapa seguinte da síntese da porfirina, duas moléculas de ALA condensam para formar porfobilinogênio. A forfobilinogênio-sintase, que catalisa essa reação, é uma enzima contendo zinco extremamente sensível ao envenenamento por metais pesados. A uroporfirinogênio I sintase catalisa a condensação simétrica de quatro moléculas de porfobilinogênio. Quando quatro moléculas de CO_2 são removidas, catalisada pela uroporfirinogênio–descarboxilase, o coproporfirinogênio é sintetizado. A

reação é seguida pela remoção de duas moléculas de CO_2 adicionais, formando assim, o protoporfirinogênio IX. A oxidação do grupos metilenos do anel porfirínico produz a protoporfirina IX, o precursor direto do heme. A etapa final da síntese do heme é a inserção de Fe^{2+}, uma reação que ocorre espontaneamente mas é acelerada pela ferroquelatase.

A protoporfirina IX é também um precursor das clorofilas. Após a incorporação de magnésio (Mg^{2+}), a enzima Mg-protoporfirina-metilesterase catalisa a adição do grupo metila para formar Mg-protoporfirina IX monometilester. Essa molécula é então convertida em clorofila em várias reações induzidas pela luz.

F. Degradação do grupo heme

Com cerca de 120 dias de vida, as células vermelhas “envelhecem” pelo esgotamento das enzimas eritrocitárias. Como conseqüência, elas são removidas da circulação pelos macrófagos do sistema retículo endotelial (baço, fígado e medula óssea) onde são degradadas. O ferro retorna ao plasma e se liga à tranferrina. A globina é degradada em seus aminoácidos componentes para posterior reutilização. A protoporfirina IX forma bilirrubina.

A protoporfirina é oxidada à *biliverdina* – um pigmento verde escuro – e monóxido de carbono (CO) pela heme−oxigenase. A biliverdina é convertida em *bilirrubina*, um tetrapirrol insolúvel em soluções aquosas, em reação catalisada pela biliverdina−redutase.

Bilirrubina

A bilirrubina produzida no SRE é apolar e insolúvel em água e é transportada para o fígado via corrente circulatória ligada de maneira firme mas reversível, à albumina.

A bilirrubina isolada da albumina entra na célula hepática e é conjugada pela ação da *uridina−difosfato−glicuronil−transferase* (UDPGT) com o ácido UDP−glicurônico para produzir o monoglicuronídio e o diglicuronídio da bilirrubina (*bilirrubuna conjugada*). O derivado conjugado, solúvel em água, é excretado do hepatócito na forma de bile e constitui um dos pigmentos biliares. Devido a solubilidade em água, a bilirrubina conjugada é encontrada em pequenas quantidades tanto no plasma como na urina. No intestino grosso, a bilirrubina é degrada por enzimas bacterianas para formar *urobilinogênio.*

A *icterícia* é a pigmentação amarela da pele, esclerótica e membranas mucosas, resultante do acúmulo de bilirrubina ou de seus conjugados. Torna-se evidente clinicamente quando as concentrações plasmáticas de bilirrubina total excedem 3,0 mg/dL, apesar de graus menores também

terem significância clínica. A icterícia é o sinal mais precoce de uma série de patologias hepáticas e biliares.

Resumo

1. Os organismos fixadores de nitrogênio convertem N_2 em NH_3 em reação consumidora de ATP. O nitrato e nitrito pode também serem reduzidos a NH_3.
2. A amônia é incoporada à glutamina pela ação da glutamina–sintetase.
3. A transaminase emprega um grupo prostético PLP para catalisar a intrconversão reversível de α–aminoácidos e α–cetoácidos.
4. Os organismos variam grandemente em suas capacidades de sintetizar aminoácidos. Alguns organismos (exemplo, plantas e alguns microorganismos) podem produzir todas as moléculas de aminoácidos necessárias a partir da fixação de nitrogênio. Os animais podem produzir somente alguns aminoácidos. Os aminoácidos não essenciais são produzidos a partir de moléculas precursoras, enquanto os aminoácidos essenciais devem ser obtidos da dieta.
5. Nas reações de transaminação (uma das mais proeminentes dos aminoácidos), novos aminoácidos são produzidos quando os grupos α-amino são transferidos do doador α–aminoácido ao receptor α-cetoácido. Como as reações de transaminação são reversíveis, elas atuam tanto na síntese como na degradação. Os íons amônio ou o nitrogênio amida da glutamina podem ser diretamente incorporados aos aminoácidos e, eventualmente, a outros metabólitos.
6. Os aminoácidos são classificados como cetogênicos ou glicogênicos com base no destino de seus esqueletos carbonados se são convertidos em ácidos graxos/corpos cetônicos ou glicose. Alguns aminoácidos são classificados tanto cetogênicos como glicogênicos porque seus esqueletos carbonados são precursores de gorduras e de carboidratos.
7. Os aminoácidos são precursores de muitas biomoléculas fisiologicamente importantes. Muitos dos processos que sintetizam essas moléculas envolvem a transferência de grupos de monocarbonos (exemplo, metila, metileno, metenil e formil). A S-adenosilmetionina (SAM) e tetraidrofolato (THF) são os mais importantes carreadores de grupos de um carbono.
8. Muitas moléculas derivadas dos aminoácidos incluem vários neurotransmissores (exemplo, GABA, catecolaminas, serotonina, histamina e óxido nítrico) e hormônios (exemplo, ácido indol acético). A glutationa é um exemplo de derivado de aminoácido que exerce um papel essencial nas células. O heme é um exemplo de um sistema complexo de anéis heterocíclicos derivado da glicina e da succinil–CoA. A via biossintética que produz heme é similar a uma que produz as clorofilas nas plantas.
9. A porfirina do heme é degradada para formar o produto de excreção, a bilirrubina em um processo de biotransformação que envolve as enzimas heme oxigenase e biliverdina-redutase e UDP–glicurosiltransferase. Após sofre reações de conjugação, a bilirrubina é excretada como um componente da bile.

Referências

BROSNAN, J. T. Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism. **J. Nutr., 130:**988S-990S, 2000.

HORTON, H. R., MORAN, L. A., OCHS, R. S., RAWN, J. D., SCRIMGEOUR, K. G. **Principles of biochemistry.** 3 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2002. p. 531-67.

McKEE, T., McKEE, J.R. **Biochemistry:** The molecular basis of live. 3 ed. New York : McGraw-Hill, 2003. p. 449-529.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger:** Princípios de bioquímica. 3 ed. São Paulo : Sarvier, 2002. p. 639-81.

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica.** Porto Alegre : Artmed, 2000. p. 562-610.

Informações adicionais

Metabolic Pathways of Biochemistry: http://www.gwu.edu/~mpb/

The Medical Biochemistry Page: http://www.indstate.edu/thcme/mwking/home.html

Biochemistry (Moskow): http://www.protein.bio.msu.su/biokhimiya/

Capítulo

12

VALTER T. MOTTA

BIOQUÍMICA BÁSICA

Regulação do Metabolismo Energético

12

Regulação do Metabolismo Energético

Objetivos

1. Compreender as estratégias intracelulares de regulação do metabolismo.
2. Discutir o controle extracelular do metabolismo em relação a influência hormonal sobre o metabolismo celular.
3. Discutir a produção e o papel dos segundos mensageiros na transdução de sinal.
4. Discutir o mecanismo de ação dos hormônios hidrofóbicos.

A operação simultânea das vias anabólicas (síntese) e catabólicas (degradação) seria improdutiva e impraticável termodinamicamente. As diferenças existentes entre os processos sintéticos e degradativos são coordenados para facilitar a regulação das vias. O controle do metabolismo é realizado no interior da célula (controle intracelular) ou por estímulos externos à célula (controle extracelular).

12.1 Controle intracelular do metabolismo

A regulação das vias metabólicas deve ser considerada em termos das características de cada reação constituinte. A partir do conhecimento das concentrações intracelulares dos substrato(s) e produto(s) de uma reação, é possível calcular a relação *[produto]/[substrato]* e comparar o resultado obtido com o valor estabelecido para a constante de equilíbrio (K'_{eq}) da reação. Distinguem-se dois casos:

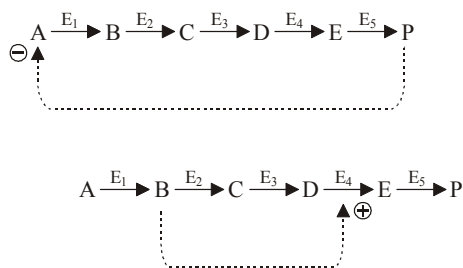
1. Reações próximas do equilíbrio. Os componentes da reação quando presentes em concentrações próximas das concentrações de equilíbrio, o valor da relação [produto]/[substrato] é próxima ao K'_{eq} e, portanto, valores de $\Delta G'$ são próximos de zero. São reações não sujeitas a regulação e rapidamente leva substratos e produtos à concentração de equilíbrio. Tais reações são facilmente revertidas por mudanças das concentrações de produtos e/ou reagentes. Mudanças nas concentrações dos substratos produzem rápida e concomitante alteração nos níveis do produto até que o equilíbrio seja atingido. Do

mesmo modo, quando os produtos estiverem em excesso, a reação ocorrerá na direção inversa até que as concentrações de equilíbrio sejam atingidas. *A velocidade dessas reações é regulada pela concentração relativa de substratos e de produtos.*

2. Reações longe do equilíbrio. O valor da relação *[produto]/[substrato]* apresenta-se distante da K'_{eq} e a $\Delta G'$ é grande (reações irreversíveis). A atividade da enzima é baixa e não permite que o equilíbrio seja atingido. Conseqüentemente, os substratos acumulam-se enquanto a quantidade de produto é reduzida devido à transformação do mesmo pela enzima seguinte na via. Mudanças na atividade da enzima (ex.: interações alostéricas) podem modificar a velocidade da reação e, assim, alterar o *fluxo metabólico* (velocidade de escoamento) por meio de uma via que pode variar em resposta às necessidades metabólicas do organismo. Muitas reações que operam longe do equilíbrio são irreversíveis (exergônicas) e determinam a velocidade de toda a via metabólica. São chamadas *etapas limitantes da reação.* As enzimas que catalisam reações longe do equilíbrio estão sujeitas a regulação por diversos mecanismos.

A. Mecanismos de controle de vias metabólicas

A conservação dos recursos celulares e o controle dos fluxos metabólicos são realizados por diferentes estratégias. Baseiam-se em mecanismos de controle da atividade e concentração das enzimas:

1. *Controle alostérico.* Os efetores alostéricos negativos ou positivos ligam-se a sítios alostéricos que catalisam etapas chaves das vias metabólicas (reações essencialmente irreversíveis). Os efetores (moduladores) podem ser substratos, produtos ou co-enzimas (*ver* Capítulo 3: Enzimas).

2. *Ciclos de substratos.* São úteis quando reações opostas de não-equilíbrio – anabólicas ou catabólicas – envolvem o mesmo intermediário mas seguem em direções opostas. Em ausência de regulação, os dois metabólitos podem ser continuamente produzidos. O fluxo através de tais ciclos do substrato permite a *regulação recíproca* por diferentes enzimas alostéricas que catalisam a reação direta e a reação oposta. Os ciclos do substrato determinam a direção e a amplitude das alterações no fluxo metabólico em função das modificações nas concentrações dos efetores alostéricos.

3. *Ciclos de interconversões enzimáticas* (modificações covalentes). Realizam a "sintonia-fina" do fluxo de vias metabólicas. As enzimas envolvidas podem existir sob duas formas, fosforiladas e

não−fosforiladas. A conversão de uma forma em outra, envolve a modificação covalente da enzima. Em pH fisiológico, o grupo fosfato é portador de duas cargas negativas e a *fosforilação* resulta na introdução de grupo carregado que induz novos arranjos na estrutura protéica da enzima. A modificação conformacional pode ser revertida por *defosforilação.* A fosforilação e a defosforilação protéica é realizada por *cinases* e *fosfatases* em reações de não-equilíbrio reguladas por efetores alostéricos.

4. *Disponibilidade de substratos.* É um mecanismo que controla muitas vias metabólicas. O controle opera em vários níveis celulares:

– A *membrana plasmática* regula a entrada de nutrientes. Alguns hormônios podem ser necessários para efetuar a captação de certos nutrientes, exemplo, a insulina promove a entrada de glicose nas células-alvo.

– As *membranas intracelulares* controlam a velocidade de entrada de metabólitos em um compartimento em particular. O fluxo metabólico pode ser controlado limitando a concentração de substrato, exemplo, a velocidade de entrada da acil−CoA na matriz mitocondrial modula a velocidade da β−oxidação dos ácidos graxos.

– A *atividade metabólica de outras vias* pode influenciar a atividade enzimática. O ciclo do ácido cítrico pode ser inibido pela utilização de acetil-CoA e oxaloacetato em outras vias.

5. *Estado energético.* As vias anabólicas podem ser reguladas pela disponibilidade de energia (ATP) para conduzir as reações endergônicas. Assim, as vias catabólicas (reações exergônicas) operam em resposta as demandas por energia para aos processos biossintéticos (reações endergônicas) em reações acopladas baseadas no efeito somatório da energia livre.

6. *Alterações nas concentrações de enzimas chaves.* É um mecanismo que envolve modificações na velocidade de síntese ou de degradação de enzimas chaves em resposta às necessidades metabólicas. Altas concentrações de substrato podem induzir à síntese de novas moléculas de enzima, em fenômeno conhecido como *indução enzimática.* No início, a indução enzimática ocorre no fígado e envolve a transcrição do gene específico codificador da enzima seguido pela tradução do mRNA para gerar moléculas adicionais da enzima. De modo inverso, a presença do produto final de uma via pode interromper a síntese da enzima necessária para a sua produção, um evento chamado *repressão enzimática.* A molécula do *repressor* (produto final), inibe a síntese da enzima pertinente pelo bloqueio da transcrição do gene. O resultado é um declínio progressivo na concentração da enzima por meio de processos celulares degradativos normais. As velocidades de síntese e degradação de muitas enzimas reguladoras são alteradas por hormônios.

12.2 Controle extracelular do metabolismo

As membranas plasmáticas das células contêm receptores específicos que permitem que a célula responda a estímulos químicos externos que não podem atravessar a membrana. Nos organismos multicelulares os estímulos são:

- *Hormônios.* São mensageiros químicos sintetizados pelas glândulas endócrinas e transportados pela corrente sangüínea aos locais de ação, que costumam ser distantes do ponto de origem do hormônio.
- *Neurotransmissores.* São moléculas liberadas pelas células nervosas que atuam como sinais químicos para alterar o comportamento de células vizinhas.
- *Fatores de crescimento.* São proteínas que regulam a proliferação celular.

A. Hormônios

As atividades metabólicas intracelulares são coordenadas em algum grau por mensageiros químicos conhecidos por *hormônios*. A síntese e secreção de muitos hormônios são reguladas por complexos mecanismos de cascata e controlados em última análise, pelo sistema nervoso central. Os hormônios são produzidos por células especializadas (sistema endócrino) e transportados pelo sangue para ajustar a atividade fisiológica das células-alvo. Muitos hormônios modificam as funções celulares por alterações na atividade ou concentração de enzimas. As principais hormônios envolvidos no metabolismo energético são:

- *Hormônios polipeptídicos.* Existe uma grande variedade de hormônios polipeptídicos, como por exemplo, os hormônios hipotalâmicos e hormônios hipofisários. De grande interesse para o metabolismo energético são os hormônios insulina e glucagon. A expressão, hormônios polipeptídicos envolvem também fatores de crescimento e citocinas.
- *Hormônios derivados de aminoácidos.* Principalmente tirosina e fenilalanina. Exemplos, a adrenalina (ou epinefrina) sintetizada na medula adrenal e a tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3) produzidas pela tireóide.
- *Hormônios esteróides.* São hormônios sintetizados a partir do colesterol. Formam duas classes: os hormônios sexuais e progestacionais e os hormônios adrenais.

Os hormônios polipeptídicos e alguns hormônios derivados de aminoácidos, tais como a adrenalina, são solúveis em água (hidrofílicos), mas insolúveis em lipídeos e, portanto, não atravessam as membranas plasmáticas das células. Não penetram nas células-alvo, mas interagem com *receptores* específicos presentes na superfície celular para desencadear respostas intracelulares. As ações no interior das células são mediadas por moléculas de baixo peso molecular denominadas *segundos mensageiros* (a molécula de hormônio é o primeiro mensageiro).

Os hormônios esteróides e tireoideanos (tiroxina e triiodotironina) atuam por diferentes mecanismos. Após difusão para dentro das células-alvo, se ligam a proteínas receptoras específicas no citoplasma e se movem para o interior do núcleo onde se unem a sítios específicos do DNA. Alteram a transcrição gênica e, assim, a síntese protéica.

B. Transdução de sinal

A *transdução de sinal* é a capacidade da célula em responder aos sinais extracelulares por meio de um conjunto de proteínas que reconhecem o sinal hormonal, transmitem o sinal para o interior da célula e medeiam alterações da atividade enzimática e da expressão gênica.

As vias de transdução de sinal variam grandemente em seus detalhes moleculares, no entanto, certos elementos são semelhantes:

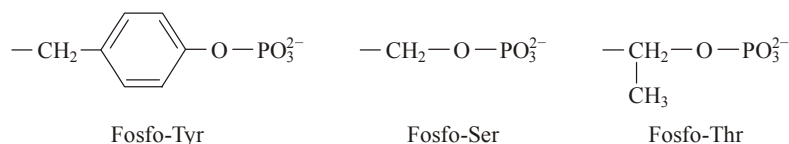
1. Os receptores localizados na superfície das células reconhecem as características estruturais do ligante (moléculas extracelulares). O ligante pode ser um fator de crescimento ou um hormônio peptídico, um neurotransmissor ou uma molécula odorante. A ligação do receptor a seu ligante é altamente específica, envolvendo interações hidrofóbicas ou interações eletrostáticas.

2. Os receptores são proteínas transmembrana que se comunicam tanto com o exterior como com o interior da célula. A ligação do ligante altera a conformação da molécula do receptor, transmitindo assim, o sinal através da membrana.

3. Alterações conformacionais podem modificar as interações do receptor com outras proteínas ou podem estimular a própria atividade catalítica. Por exemplo, alguns receptores são enzimas enquanto outros são canais iônicos que abrem ou fecham em resposta a ligação do ligante.

4. A ligação do ligante ao receptor inicia uma série de eventos que ocorrem em cascata com cada componente da via de sinalização ativando a seguinte. Essas etapas servem para amplificar o sinal inicial. Muitas vias sinalizadoras envolvem *proteínas–cinases,* enzimas que transferem o grupo fosforil do ATP para um substrato polipeptídico. As cinases são de dois tipos: as *tirosina-cinases* transferem um grupo fosforil para o grupo OH de uma cadeia lateral da Tyr. As *Ser/Thr-cinases* transferem o grupo para a cadeia lateral da Ser ou Thr.

$-CH_2-C_6H_4-O-PO_3^{2-}$ (Fosfo-Tyr) $\quad -CH_2-O-PO_3^{2-}$ (Fosfo-Ser) $\quad -CH(CH_3)-O-PO_3^{2-}$ (Fosfo-Thr)

Fosfo-Tyr　　Fosfo-Ser　　Fosfo-Thr

5. Vias sinalizadoras constituídas por enzimas que geram sinais intracelulares chamados *segundos mensageiros* (para distinguir do primeiro mensageiro ou extracelular). Os segundos mensageiros incluem íons cálcio e derivados nucleotídicos e lipídicos, que difundem por alguma distância no citosol celular. Os movimentos dos segundos mensageiros ou outros

componentes da via sinalizadora podem ser necessários para que um sinal extracelular promova alterações em vias metabólicas cujas enzimas estão localizadas longe da superfície celular ou no interior de organelas. Se a via sinalizadora altera a expressão gênica, o sinal deve viajar até o núcleo, onde é reconhecido por mecanismos de importação nuclear. Os mais importantes segundos mensageiros são: AMP cíclico (AMPc), GMP cíclico (GMPc), 1,2−diacilglicerol (DAG), inositol−1,4,5−trifosfato (IP_3) e Ca^{2+}.

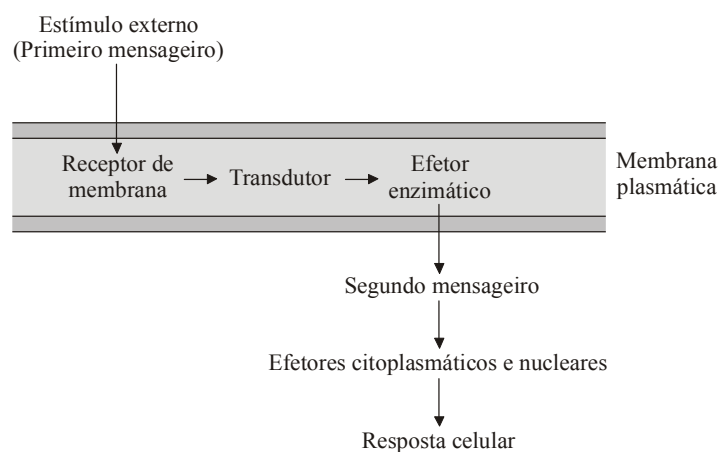



Figura 12.1
Mecanismos gerais de transdução de sinal através da membrana plasmática da célula.

6. Via de sinalização com chave liga/desliga. O mesmo sinal que inicia uma resposta intracelular pode também ativar um mecanismo de redução da resposta. Por exemplo, a ativação de uma proteína-cinase muitas vezes desencadeia a ativação de uma *fosfatase*, uma enzima que remove o grupo fosforil e assim, restabelece os componentes sinalizadores ao seu estado de repouso. Esse mecanismo tende a limitar tanto a extensão como a duração dos efeitos de um hormônio.

D. Ação da insulina

Logo após uma refeição, a concentração da glicose sangüínea pode aumentar em cerca de 8 mM, em relação à concentração normal de 3,6–5,6 mM. O aumento da glicose circulante desencadeia a liberação do hormônio insulina.

A insulina é um hormônio polipeptídico de 51 aminoácidos, secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas (Langerhans), que promove a utilização da glicose, a síntese de proteínas e a formação e o armazenamento de triacilgliceróis. As principais ações metabólicas da insulina são:

- *Músculo e outros tecidos.* Promovem o transporte da glicose para o interior das células, estimulam a síntese do glicogênio e suprimem a degradação do glicogênio.

- *Adipócitos.* Ativa a lipase lipoprotéica extracelular, aumenta o nível da acetil−CoA−carboxilase e estimula a síntese de triacilgliceróis.

Uma vez liberada para o sangue, a insulina liga-se aos receptores de insulina na superfície das células dos músculos e outros tecidos. O receptor de insulina é um membro de uma família de receptores de superfície celular que se ligam a vários polipeptídeos, por exemplo, EGF (fator de crescimento epidérmico), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e IGF−I (fator de crescimento semelhante à insulina). Apesar das diferenças estruturais existentes entre os membros do grupo, eles possuem algumas características em comum: (1) um domínio externo que interage com ligantes extracelulares específicos, (2) um segmento transmembrana e (3) um domínio catalítico citoplasmático com atividade *tirosina−cinase*. Quando um ligante (por exemplo, a insulina) interage com o domínio externo, uma mudança conformacional na proteína receptora ativa o domínio tirosina−cinase. A tirosina-cinase ativa inicia uma cascata de fosforilação que provoca a autofosforilação do domínio tirosina−cinase.

O receptor de insulina é uma glicoproteína transmembrana composta por estrutura quaternária $(\alpha\beta)_2$. Duas grandes subunidades α (135 kD) são extracelulares, onde se liga a insulina. Cada subunidade β (95 kD) em sua porção intracelular, contém um segmento transmembrana e domínios com atividade de tirosina−cinase. Na ausência do hormônio, os dois domínios intracelulares das subunidades β estão separados. A ligação da insulina desencadeia uma modificação conformacional no receptor que junta os domínios. Cada domínio intracelular da subunidade β é uma tirosina−cinase que promove a autofosforilação. A tirosina−cinase também fosforila um ou mais resíduos de tirosina em outras proteínas, incluindo a IRS−1 (substrato−1 do receptor de insulina) que desencadeia eventos adicionais na célula.

A ligação da insulina às subunidades α ativa a tirosina−cinase do receptor e causa a fosforilação em cascata que modula várias proteínas intracelulares. Por exemplo, a insulina ligada inibe a lipase sensível a hormônios nos adipócitos. Aparentemente, isso ocorre pela ativação de uma fosfatase que defosforila a lipase. Além disso, vários estudos sugerem que segundos mensageiros também são empregados, por exemplo, o inositol monofosfato ou 1,2−diacilglicerol (DAG), na ativação da proteína−cinase C.

A ligação de insulina inicia uma cascata de fosforilação que induz a transferência de várias proteínas para a superfície celular. Exemplos dessas moléculas incluem certas isoformas dos transportadores de glicose e os receptores de LDL e IGF−II. O movimento das moléculas para a membrana plasmática na fase pós−absortiva do ciclo jejum−alimentado, promove a captação de nutrientes pela célula e sinais promotores do crescimento.

Componentes adicionais das vias de transdução de sinal contêm uma região conhecida como domínio SH2 formada por uma cadeia lateral de Arg que interage com os grupos fosfo-Tyr do receptor e com outras proteínas. Essas interações permitem que a ligação de um hormônio altere a atividade de várias proteínas intracelulares. Em um

caso, uma porção do receptor é clivada por uma protease e viaja até o núcleo, onde modula a transcrição gênica.

Insulina altera os processos metabólicos

Somente as células que possuem receptores para a insulina respondem ao hormônio e, o tipo de resposta, varia para cada tipo de célula. Nos tecidos insulina-responsivos como os músculos e o tecido adiposo, a insulina estimula fortemente o transporte de glicose para o interior das células. A V_{max} para o transporte da glicose aumenta, não porque a insulina altera a atividade catalítica intrínsica do transportador, mas porque a insulina aumenta o número de transportadores da superfície celular. Esses transportadores denominados GLUT4 (transportador de glicose isoforma 4) para distinguir de outras proteínas transportadoras de glicose, são estimulados nas membranas de vesículas intracelulares. Quando a insulina se liga à célula, a vesícula funde-se com a membrana plasmática. Essa translocação do transportadores para a superfície celular aumenta a velocidade pela qual a glicose entra na célula. A GLUT4 é um transportador passivo, que opera de forma similar ao transportador de glicose nos eritrócitos. Quando o estímulo insulínico é removido, os transportadores retornam para as vesículas intracelulares por endocitose.

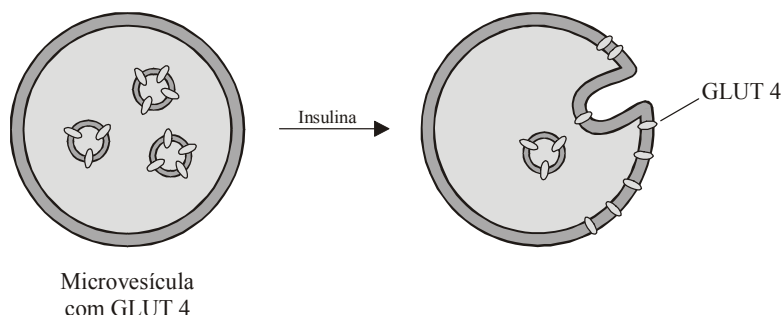



Figura 12.2
Efeito da insulina sobre o GLUT4. A insulina estimula a fusão da microvesícula com a proteína transportadora de glicose GLUT4 aumentando o número de transportadores de glicose na membrana plasmática.

A insulina estimula a captação de ácidos graxos e glicose. Quando o hormônio se liga ao seu receptor no tecido adiposo, ocorre a ativação da proteína extracelular lipase lipoprotéica, que remove os ácidos graxos das lipoproteínas circulantes para serem captados e armazenados nos adipócitos.

A ligação da insulina em seus receptores na superfície celular também modula as enzimas do metabolismo do glicogênio. O metabolismo do glicogênio é caracterizado pelo equilíbrio entre a síntese e a degradação do glicogênio. A síntese é realizada pela enzima glicogênio-sintase, que adiciona unidades de glicose aos terminais de um polímero de glicogênio *(ver* Capítulo 6).

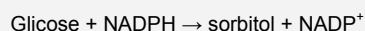
A glicogênio-fosforilase mobiliza resíduos de glicose do glicogênio por fosforólise (clivagem pela adição de um grupo fosfato em lugar de água) para a glicólise. A insulina participa indiretamente da regulação da glicogênio−sintase e da glicogênio−fosforilase. O

receptor tirosina–cinase para a insulina ativa outras proteínas, incluindo fosfatases que defosforilam (ativam) a glicogênio–sintase e defosforilam (desativam) a glicogênio–fosfarilase. Isso resulta na aceleração da síntese do glicogênio enquanto a velocidade da glicogenólise diminui. De fato, as múltiplas cinases e fosfatases interagem com as enzimas do metabolismo do glicogênio para produzir uma sintonia fina na regulação que, ao final, é controlada por sinais introduzidos por hormônios extracelulares.

Quadro 12.1 Efeitos metabólicos do diabetes

A característica fundamental do diabetes não-tratado é a *hiperglicemia* crônica (elevadas taxas de glicose no sangue). A perda de sensibilidade pelos tecidos à insulina promove a falta de captação de glicose. O metabolismo responde como se não existisse glicose disponível, de tal modo que a gliconeogênese aumenta produzindo maior hiperglicemia. A glicose circulante em altas concentrações participa da glicação não-enzimática das proteínas. Esse processo é lento, mas as proteínas glicadas podem gradualmente acumular e danificar tecidos provocando, por exemplo, doença arterial coronária, retinopatia, nefropatia, catarata e neuropatia.

A lesão tecidual também pode resultar de efeitos metabólicos da hiperglicemia. Como os músculos e o tecido adiposo são incapazes de aumentar a captação de glicose em resposta à insulina, a glicose penetra em outros tecidos. No interior dessas células, a *aldose-redutase* catalisa a conversão da glicose em sorbitol:

$$\text{Glicose} + \text{NADPH} \rightarrow \text{sorbitol} + \text{NADP}^+$$

Como a aldose-redutase tem um K_m elevado para a glicose (ao redor de 100 mM), a velocidade da reação é normalmente muito lenta. No entanto, sob condições hiperglicêmicas, o sorbitol acumula e pode alterar o equilíbrio osmótico da célula que modifica a função renal e desencadeia a precipitação de proteínas em outros tecidos. A agregação das proteínas no cristalino leva à catarata. Os neurônios e as células que revestem os vasos sangüíneos também podem ser lesados, aumentando a probabilidade de neuropatias e problemas circulatórios que em casos severos resultam em infarto do miocárdio, derrames ou amputação das extremidades.

O diabetes é também uma desordem do metabolismo das gorduras, pois a insulina normalmente estimula a síntese de triacilglicerol e suprime a lipólise nos adipócitos. O diabetes não-controlado tende a metabolizar os ácidos graxos em lugar dos carboidratos, o que resulta na produção de corpos cetônicos. O excesso de produção de corpos cetônicos leva a cetoacidose diabética.

No diabetes, o organismo acredita estar em jejum. Paradoxalmente, cerca de 80% dos pacientes com diabetes tipo 2 são obesos. A obesidade – particularmente com grandes depósitos abdominais – está fortemente correlacionada com o desenvolvimento da doença. Isso se deve ao aumento dos níveis de ácidos graxos circulantes que podem interferir no metabolismo de outros combustíveis metabólicos, os carboidratos. Desse modo, as células empregam menos glicose como combustível. Como resposta, as células β do pâncreas deveriam aumentar a produção de insulina (alguns tipos de diabetes tipo 2 apresentam elevados teores de insulina) no entanto, eventualmente ela está reduzida.

O tecido adiposo exerce um papel ativo no desenvolvimeto de diabetes do tipo 2. Os adipócitos não são depósitos inertes de gordura mas sintetizam ativamente hormônios peptídicos e esteróides, que atuam em outros órgãos incluindo o cérebro. Por exemplo, os adipócitos secretam *leptina*, um hormônio que ajuda a regular o apetite e contribui no desenvolvimento da obesidade.

Os adipócitos também produzem dois hormônios, *fator de necrose tumoral α* (TNF–α) e *resistina*. O hormônio protéico resistina pode explicar como a obesidade se relaciona ao diabetes tipo 2. Em pessoas obesas, os adipócitos produzem níveis aumentados de resistina que atuam prejudicando o funcionamento dos receptores de insulina que existem na célula. Assim, as células deixam de responder à insulina quando existe muita resistina no sangue. Deste modo, as pessoas obesas têm mais resistina e, como conseqüência, respondem pior à insulina, desenvolvendo diabetes.

Certos fármacos empregados para tratar o diabetes tipo 2 parecem diminuir a quantidade de resistina secretada pelos adipócitos. No entanto, o papel da resistina sob condições normais (não-diabéticos) permanece obscura.

C. Ação do glucagon e das catecolaminas

Algumas horas após uma refeição, a glicose da dieta foi captada pelas células e consumida como combustível, armazenada como glicogênio ou convertida em ácidos graxos para ser utilizada a longo prazo. A partir desse momento, o fígado inicia a mobilização da glicose para manter a concentração da glicose sangüínea constante. Essa fase do metabolismo não mais é regulada pela insulina mas por outros hormônios, principalmente o glucagon e as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina).

O glucagon, um hormônio peptídico com 29 resíduos de aminoácidos, é sintetizado e liberado pelas células α das ilhotas pancreáticas quando a concentração da glicose sangüínea começa a cair abaixo de 5 mM. De modo diferente da insulina, o glucagon estimula o fígado para liberar a glicose produzida pela glicogenólise e gliconeogênese, e estimula a lipólise no tecido adiposo para liberar os ácidos graxos para a circulação. As células musculares não apresentam receptores para o glucagon e, portanto, não responde ao hormônio.

Apesar dos mecanismos de transdução de sinais diferirem um pouco, as catecolaminas promovem os mesmos efeitos gerais que o glucagon. Por exemplo, o estímulo da adrenalina sobre as células musculares ativa a glicogenólise, que disponibiliza mais glicose para a contração muscular. As catecolaminas são derivadas da tirosina e sintetizadas pelo sistema nervoso central como neurotransmissores ou pela medula adrenal como hormônios. As ações das catecolaminas são mediadas por duas classes de receptores na superfície celular, os receptores *α–adrenérgicos* e os *β–adrenérgicos*.

Os receptores do glucagon e os receptores adrenérgicos, tais como, o receptor β−adrenérgico, são glicoproteínas transmembranas que possuem *sete α–hélices transmembranas* (receptores serpenteantes). Esses receptores possuem uma extremidade N−terminal extracelular que contém o local de ligação do hormônio (sete seqüências de 20−25 resíduos hidrofóbicos cada) que formam três alças extracelulares e três alças intracelulares além de uma porção no lado citosólico da membrana plasmática na qual a proteína G particular se liga. Os receptores do glucagon e das catecolaminas não são tirosina−cinases, mas a ligação desses hormônios desencadeiam alterações conformacionais que afetam a porção intracelular da proteína. Acredita-se que esses receptores atuam como proteínas alostéricas que alternam entre duas conformações, em resposta ao ligante ligado.

Proteínas G: mediadores intracelulares

No interior das células, uma proteína trimérica conhecida como *proteína G* interage com a porção intracelular de receptores. As proteínas G são assim chamadas por que ligam GDP e GTP. Os três tipos de subunidades da proteína G são designadas α, β e γ. Na forma inativa, a proteína G existe como um trímero ligado a GDP pela subunidade α. A ligação de um ligante a um receptor apropriado desencadeia uma alteração conformacional da proteína G, que é provavelmente mediada por uma extensão C-terminal da subunidade α. Como resultado, a subunidade α libera a GDP e, em seguida, liga a GTP em seu lugar. O terceiro grupo fosfato da GTP não é facilmente acomodado no trímero αβγ, de tal modo que a subunidade α se dissocia dos componentes βγ, que permanecem fortemente ligados como um dímero. *Uma vez dissociados, tanto a subunidade* α_{GTP} *como o dímero βγ tornam-se ativos; ou seja, eles interagem com componentes celulares na via de transdução de sinal.*

A atividade sinalizadora da proteína G está limitada pela atividade da *GTPase* intrínsica da subunidade α, que hidrolisa GTP a GDP + P_i. A hidrólise do GTP permite que as três subunidades da

proteína G retornem à sua conformação original ($\alpha_{GDP}\beta\gamma$) (Figura 12.2).

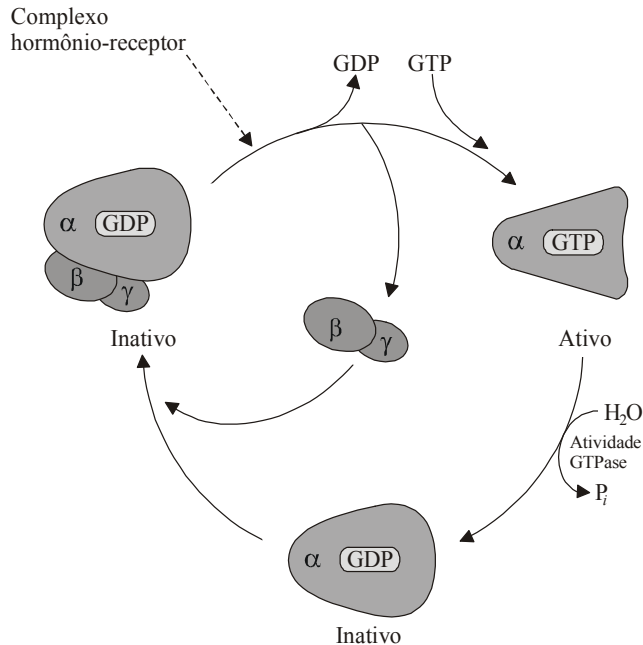
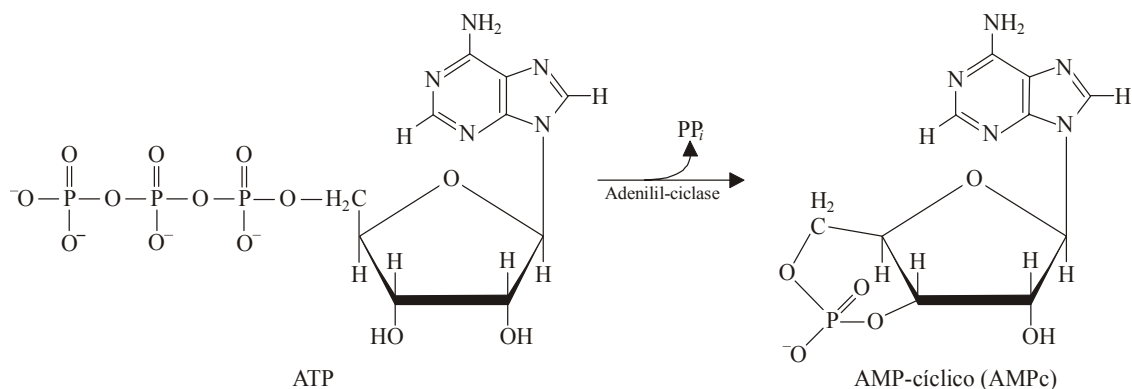



Figura 12.2
Ciclo da proteína G. O trímero $\alpha\beta\gamma$, com o GDP ligado a subunidade α, é inativo. A ligação do ligante ao receptor associado com a proteína G desencadeia modificações conformacionais que causam a substituição do GDP pelo GTP e a subunidade α se dissocia do dímero $\beta\gamma$. As duas porções da proteína G são ativas na via de sinalização. A atividade da GTPase do subunidade α retorna a proteína G a sua forma trimérica inativa.

O nucleotídeo GDP ligado à proteína G trimérica dissocia com uma velocidade basal de cerca de 10^{-5} s^{-1}, o que significa que a ativação fisiológica da proteína G (a liberação de GDP e a ligação de GTP) pode levar horas. *In vivo*, a troca de GDP pelo GTP ocorre em menos de um segundo pela ajuda de proteínas conhecidas como GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*). De modo similar, a velocidade catalítica GTPase é muitas vezes aumentada por proteínas acessórias conhecidas como GAPs (*GTPase activating proteins*), que impulsionam a atividade da GTPase de cerca de 2–4 min^{-1} para, aproximadamente, 10^2–10^3 min^{-1}.

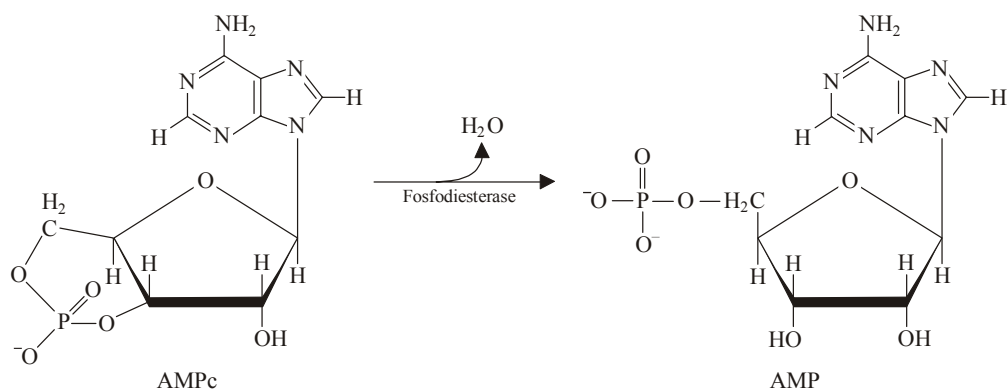
Via adenilil–ciclase

As subunidades separadas α_{GTP} e $\beta\gamma$ exercem diferentes efeitos sobre as proteínas celulares. Por exemplo, a subunidade α_{GTP} liga e ativa alostericamente a enzima *adenilil–ciclase*, uma proteína integral presente na superfície interna da membrana que catalisa a síntese de AMP cíclico (AMPc) a partir de ATP:

ATP → (Adenilil-ciclase; PP_i) → AMP-cíclico (AMPc)

O sítio catalítico da adenilil–ciclase inclui duas cadeias laterais Asp também como íons metálicos (provavelmente Mg^{2+}) que coordena com os dois resíduos Asp e os grupos fosfato do ATP.

O AMPc é um segundo mensageiro, uma substância pequena e altamente solúvel que pode livremente difundir na célula. O AMPc ativa uma Ser/Thr cinase chamada *proteína–cinase A.* Na ausência de AMPc, essa cinase é um tetrâmero inativo formado por duas subunidades reguladoras (R) e duas catalíticas (C)

Consequentemente, *o nível de segundo memsageiro AMPc determina o nível de atividade da proteína-cinase A.* O sinal AMPc (e portanto, a atividade da proteína-cinase A) é desligado pela ação da fosfodiesterase que converte o AMPc em AMP:

AMPc → (H_2O; Fosfodiesterase) → AMP

Um dos alvos intracelulares da proteína–cinase A é a *fosforilase–cinase*, a enzima que fosforila (desativa) a glicogênio–sintase e fosforila (ativa) a glicogênio-fosforilase. Os eventos sinalizadores explicam como hormônios como o glucagon e adrenalina, que desencadeiam a produção de AMPc, promovem a glicogenólise e inibem a síntese do glicogênio. Embora a fosforilase–cinase seja ativado pela proteína–cinase A, ela só é ativada ao máximo quando os íons Ca^{2+} estão presentes como resultado de outras vias sinalizadoras (*ver* adiante).

Os receptores com sete hélices transmembranas, modificam a sua conformação em resposta ao estímulo externo a, assim, ativam as proteínas G. Esses receptores são responsáveis pela transmissão de informações provenientes de diferentes sinais.

A estimulação da adenilil-ciclase pela proteína G é de curta duração, pois a subunidade G_α é também uma GTPase que hidrolisa o GTP a GDP + P_i. Em função da ação da GTPase da subunidade G_α, a atividade da adenilil-ciclase depende da estimulação hormonal contínua, cessando em ausência do hormônio. Isso é fundamental para o segundo mensageiro que uma vez gerado deve ser desativado rapidamente.

As proteínas alvo afetados pelo AMPc dependem do tipo de célula. Além disso, vários hormônios podem ativar a mesma proteína G. Portanto, diferentes hormônios podem realizar o mesmo efeito. Por exemplo, em células hepáticas a degradação do glicogênio pode ser iniciada tanto pela adrenalina como pelo glucagon.

Além das proteínas G que ativam a adenilil–ciclase, existem proteínas G inibitórias que promovem a redução dos níveis de AMPc por ligação em diferentes sítios da proteína adenilil–ciclase. Assim, o mesmo hormônio pode criar efeitos estimuladores pela ligação a um dos receptores mas também pode causar inibição por ligação a outro tipo de receptor. Outras proteínas G ativam a AMPc fosfodiesterase, produzindo efeitos similares nos processos dependentes de AMPc. Consequentemente, a resposta celular a um sinal hormonal não depende somente da presença do receptor apropriado, mas também se a proteína G associada está na forma ativada ou inibitória. Como um único tipo de hormônio pode ativar dois tipos de proteína G, o sistema sinalizador pode ser ativo somente por curtos períodos antes de ser desativado.

Figura 12.3
Resumo da regulação da glicogênio-sintase e da glicogênio-fosforilase

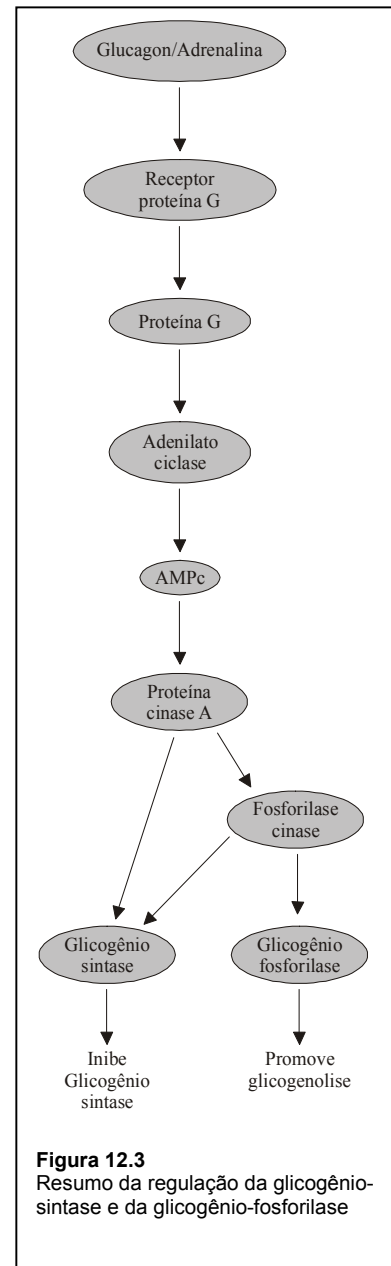
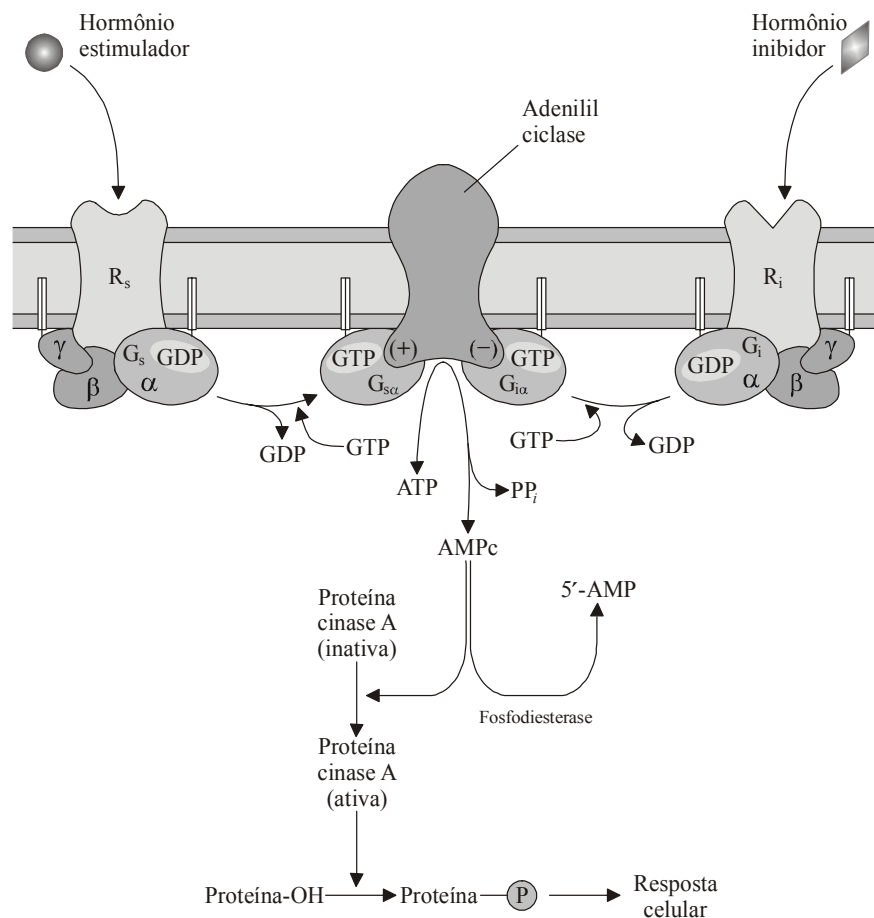



Figura 12.4
Sistema de sinalização da adenilil-ciclase. A ligação do hormônio ao receptor R_S promove sua ligação à proteína G estimuladora (G_S) que estimula a troca de GDP por GTP na sua subunidade $G_{S\alpha}$. Outros hormônios podem se ligar ao receptor inibitório (R_i) que está acoplado à adenilil–ciclase pela proteína G inibitória (G_i). A G_S ativa a adenilil–ciclase, enquanto a G_i inibe-a. O AMPc ativa a proteína-cinase A, resultando na fosforilação das proteínas celulares.

As proteínas G participam de outras vias de sinalização

Via guanilil- ciclase

Um dos importantes alvos das proteínas G é a guanilil–ciclase, enzima que catalisa a transformação de trifosfato de guanosina (GTP) em GMP cíclico (GMPc), um segundo mensageiro. Apesar da síntese de GMP cíclico ocorrer em quase todos os tecidos animais, seu papel no metabolismo celular ainda não foi plenamente esclarecido. Duas guanilil–ciclase estão envolvidas na transdução de sinal. Uma está ligada à membrana e atua como receptora de hormônio. A outra é uma enzima citoplasmática.

1. Guanilil–ciclase ligada à membrana. Dois tipos de moléculas ativam a guanilil–ciclase ligada à membrana: o fator natriurético atrial e a enterotoxina bacteriana.

- *Fator natriurético atrial* (FNA). É um peptídeo liberado das células atriais cardíacas em resposta ao volume de sangue. O efeito fisiológico do FNA é reduzir a pressão sangüínea via vasodilatação e diurese (aumento da excreção urinária) por meio do GMPc. O GMPc citosólico ativa a fosforilação da enzima proteína-cinase G. O papel dessa enzima na mediação dos efeitos do FNA ainda não foi esclarecido. O FNA ativa a guanilil–ciclase em vários tipos de células. Por exemplo, nos túbulos coletores renais, a síntese de GMPc estimulada pelo FNA, aumenta a excreção renal do Na^+ e água.
- *Enterotoxina bacteriana.* A ligação da enterotoxina (produzida por várias espécies de bactérias) à guanilil–ciclase encontrada na membrana plasmática das células intestinais causa diarréia. Por exemplo, determinadas linhagens de *E. coli* produzem uma *enterotoxina termolábil* (proteína semelhante à toxina da cólera). A interação da enterotoxina ao receptor plasmático do enterócito ligado a guanilil–ciclase desencadeia a excessiva secreção de eletrólitos e água no lúmen do intestino delgado.

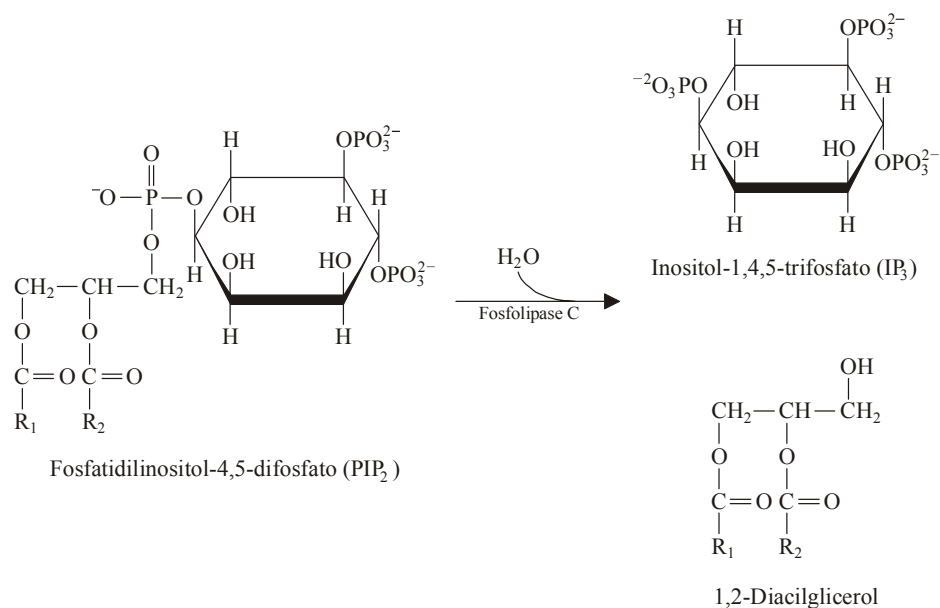
2. Guanilil–ciclase citoplasmática. A guanilil–ciclase citoplasmática possui um grupo prostético heme. A enzima é ativada pelo Ca^{2+}, assim qualquer aumento do Ca^{2+} citoplasmático promove a síntese de GMPc. Essa guanilil–ciclase é ativada pelo *óxido nítrico* (NO). Algumas evidências sugerem que a ligação do NO ao grupo heme ativa a enzima. Em vários tipos de células (exemplo, células do músculo liso), a GMPc estimula o funcionamento dos canais de íons.

Sistema do fosfoinositídeo e cálcio

O sistema do fosfoinositídeo media a ação de hormônios, de fatores de crescimento e de outros ligantes. A adrenalina liga-se a um receptor conhecido como receptor α–adrenérgico que faz parte do *sistema fosfoinositídeo* que também é formado por um receptor com sete segmentos transmembrânicos, uma proteína G e uma proteína-cinase específica. A proteína G associada com o receptor α–adrenérgico ativa a enzima celular *fosfolipase C* ligada à membrana plasmática. A enzima ativa catalisa a clivagem do *fosfatidilinositol–4,5–difosfato* (PIP_2) para formar dois segundos mensageiros: o *1,2–diacilglicerol* (DAG) e o *inositol–1,4,5–trifosfato* (IP_3).

Fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP_2)

H_2O — Fosfolipase C →

Inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3)

1,2-Diacilglicerol

O PIP_2 está presente em pequenas quantidades mas pode ser sintetizado a partir do fosfatidilinositol−4−fosfato (PIP) que, por sua vez, é produzido a partir do fosfatidilinositol (PI) por fosforilação específica.

1. Diacilglicerol (DAC). O *1,2−diacilglicerol* é um segundo mensageiro lipossolúvel que permanece na membrana plasmática e ativa a *proteína−cinase C* (PKC). Foram identificadas várias proteínas−cinase C. Dependendo da célula, a proteína−cinase C ativada fosforila enzimas reguladoras específicas ativando-as ou inativando-as. São conhecidas no mínimo 11 diferentes isoformas de proteínas−cinases C presentes em diferentes tecidos.

Em baixas concentrações de íons Ca^{2+} e em ausência de DG, as PCKs são inativas. A ligação da DG causa uma alteração conformacional que aumenta a afinidade das PCKs pelos íons Ca^{2+} e DG. Ao ligar-se à membrana plasmática, a isoenzima torna-se ativada.

2. Inositol−1,4,5−trifosfato (IP_3). O *inositol−1,4,5−trifosfato* é hidrossolúvel e se difunde desde a membrana através do citoplasma para interagir com receptores específicos do retículo endoplasmático onde se liga a um *canal de transporte de* Ca^{2+} abrindo-o e liberando o Ca^{2+} para o citosol. O efluxo dos íons cálcio dos depósitos no retículo endoplasmático induz uma modificação conformacional no receptor IP_3 que causa a abertura dos canais íons Ca^{2+} da membrana plasmática e, assim, desencadeia vários processos celulares. O principal receptor protéico para os íons Ca^{2+} é a *calmodulina* – uma proteína que se liga ao Ca^{2+}. Os complexos cálcio−calmodulina são capazes de mediar muitas reações reguladas pelo cálcio. De fato, a calmodulina é a subunidade reguladora de algumas enzimas (exemplo, a fosforilase-cinase, que converte a fosforilase *b* em fosforilase *a* no metabolismo do glicogênio).

A transmissão do sinal é encerrada pela defosforilação do IP_3 pela ação hidrolítica da *inositol−trifosfatase* para formar

inositol–1,4–bifosfato. Os íons Ca^{2+} podem retornar aos seus estoques intracelulares pela ação de uma Ca^{2+}–ATPase às custas da hidrólise de ATP.

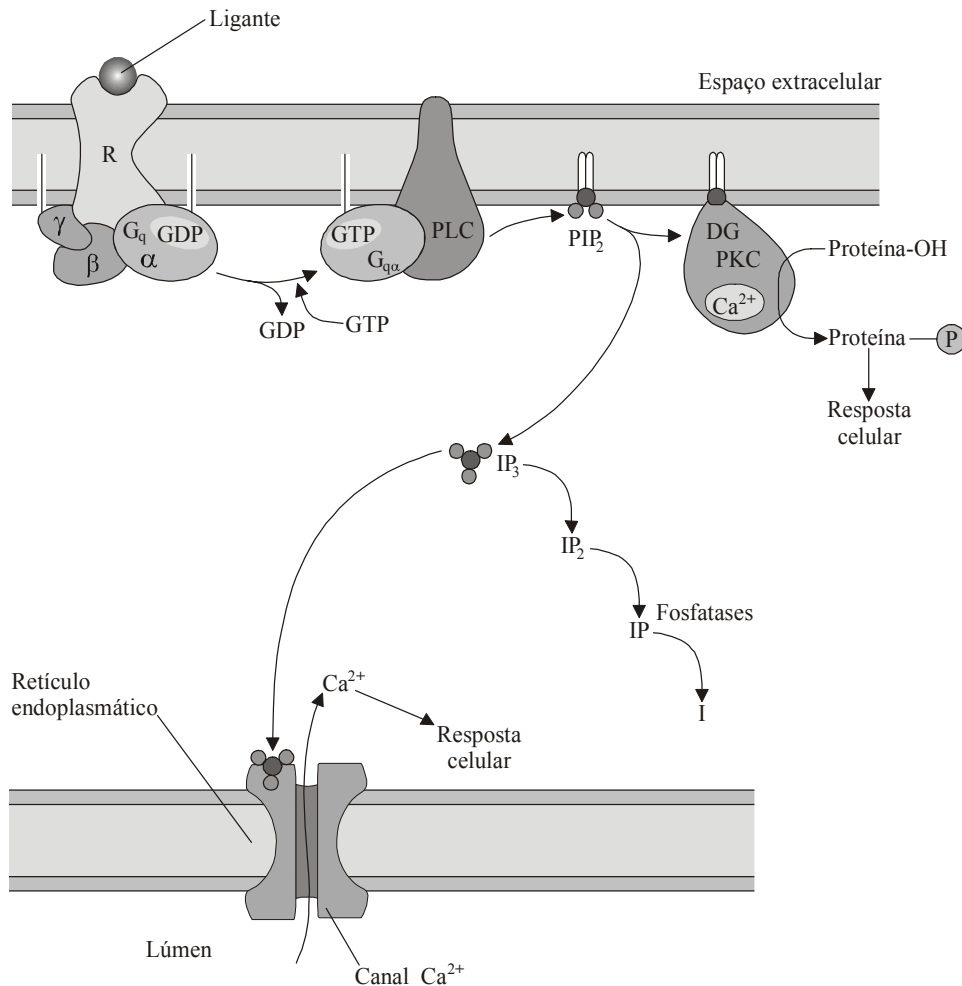



Figura 12.5
Sistema de sinalização do fosfoinositídeo. A ligação do ligante a seu receptor transmembrana R ativa a fosfolipase C (PLC) por meio da proteína G_q. A fosfolipase C catalisa a hidrólise de PIP_2 nos segundos mensageiros IP_3 e diacilglicerol (DG). O IP_3 hidrossolúvel difunde do citoplasma para o retículo endoplasmático onde estimula a liberação do Ca^{2+} que vai ativar, via calmodulina, numerosos processos celulares. O diacilglicerol permanece associado à membrana, onde – juntamente como o Ca^{2+} – ativa a proteína–cinase C (PKC), que fosforila e modula muitas proteínas celulares.

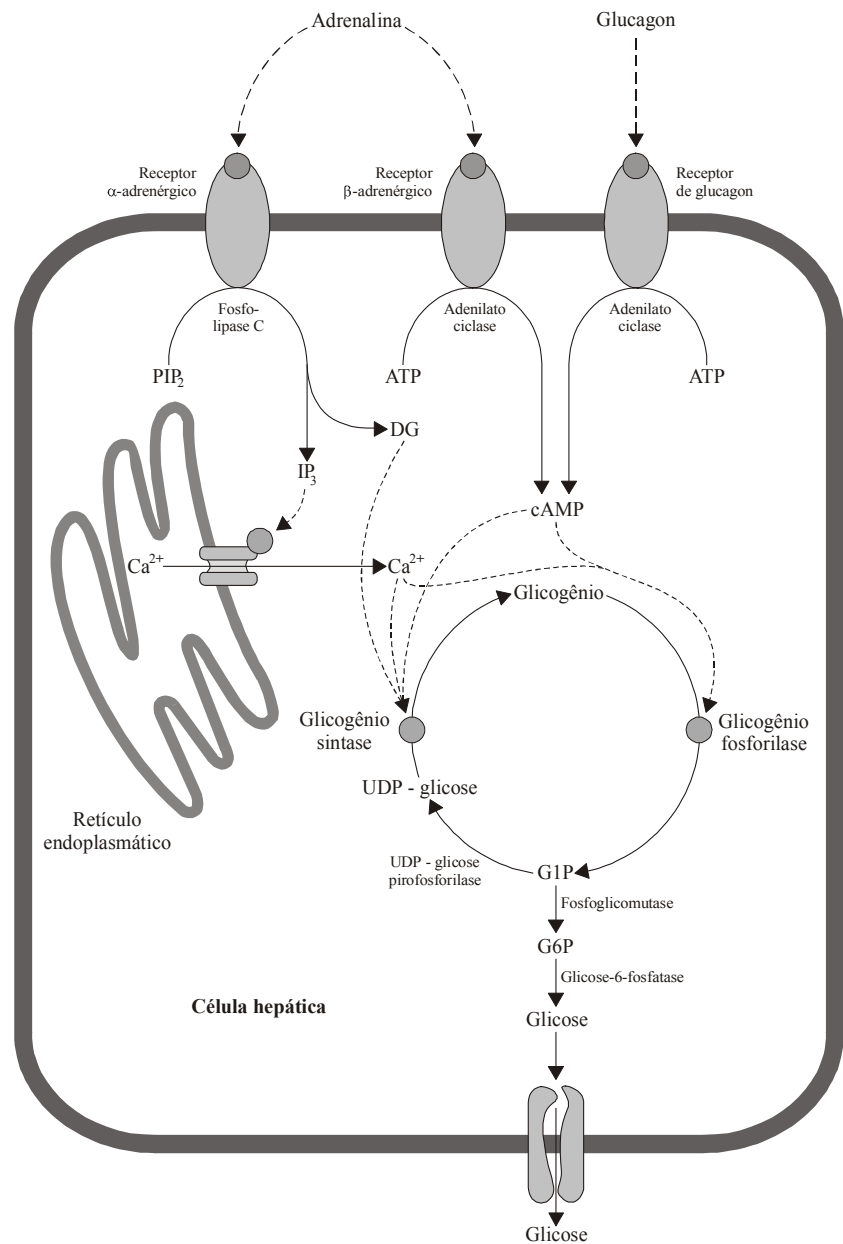



Figura 12.6
Visão geral da ação da adrenalina e glucagon no metabolismo do glicogênio. PIP_2 = fosfatidilinositol–4,5–bifosfato, IP_3 = inositol–1,4,5–trifosfato, DG = 1,2–diacilglicerol

D. Hormônios esteróides e tireoideanos

Os mecanismos de transdução de sinal das moléculas de hormônios hidrofóbicos resultam em modificações na expressão gênica. Os hormônios esteróides e tireoideanos são moléculas hidrofóbicas e lipossolúveis transportadas pelo sangue ligadas a diferentes proteínas. Os transportadores de esteróides incluem a *globulina de ligação a corticoesteróides* (CBG,

corticosteroid–binding globulin) ou *transcortina*, a *globulina de ligação a hormônios sexuais* (SHBG, sex hormone binding globulin), a *proteína de ligação a andrógeno* (BPP, androgen binding protein) e a *albumina*. Os hormônios tireodeanos são transportados pela globulina transportadora de tiroxina, pré–albumina transportadora de tiroxina e albumina.

Ao atingir as células–alvo, as moléculas de hormônios hidrofóbicos se dissociam de suas proteínas transportadoras e difundem através das membranas plasmáticas para ligarem-se aos receptores intracelulares específicos. O complexo hormônio–receptor interage com fatores de transcrição alterando a expressão gênica e afetando, assim, a síntese protéica. Enquanto os hormônios polipeptídeos e as catecolaminas efetuam alterações rápidas (dentro de segundos ou minutos) por meio de ativação ou inibição de enzimas pré–existentes, a ação dos hormônios esteróides e tireoideanos é observada em prazos mais longos (dias ou semanas).

A atividade dos hormônios hidrofóbicos é limitada nas células eucarióticas pela presença de moléculas receptoras. Os hormônios podem difundir para células não–alvo, mas em ausência de moléculas receptoras apropriadas, não exercem suas atividades. Nos tecidos–alvo, dependendo do tipo de hormônio envolvido, a interação pode ocorrer no citoplasma (exemplo, glicocorticóides) ou no interior do núcleo (exemplo, estrogênios, androgênios e hormônios tireoideanos):

- *Receptores glicocorticóides* presentes principalmente no citoplasma das células–alvo e complexados a proteínas que se ligam ao DNA para a regulação da transcrição.
- *Receptores do estradiol e progesterona* são predominantemente encontrados no núcleo.
- *Receptores de homônios tireoideanos* estão sempre ligados ao DNA.

Os receptores hormonais intracelulares existem em níveis ao redor de 100−10.000 moléculas por célula e apresentam grande afinidade por seu ligante.

Dentro do núcleo, cada complexo hormônio esteróide–receptor liga-se a segmentos específicos do DNA chamados *elementos de resposta a hormônios* (HRE), cuja "seqüência de consenso" consiste de duas seqüências de seis nucleotídeos separados por três nucleotídeos (n). As seqüências de consenso no DNA de resposta aos glicocorticóides e progesterona são:

AGAACAnnnTGTTCT
TCTTGTnnnACAAGA

Os dímeros receptores interagem com fatores de transcrição, outras proteínas ligadoras de DNA e cofatores para afetar a transcrição do gene–alvo no mRNA o qual serve como um modelo para a síntese ribossômica das proteínas. Estima-se que cada tipo de HRE pode influenciar a transcrição de 50−100 genes. Conseqüentemente, a ligação de um complexo hormônio esteróide-receptor a seu HRE induz alterações em larga escala na função celular.

O *estradiol* liga-se ao complexo receptor–hsp (hsp: proteína de choque térmico) fracamente associado com o núcleo. Após a dissociação e a dimerização do receptor, o dímero receptor liga-se ao HRE, cuja seqüência de consenso é:

AGGTCAnnnTGACCT
TCCAGTnnnACTGGA

Segue-se a transcrição e a síntese das proteínas.

Após entrar na célula, os *hormônios tireoideanos* ligam-se temporariamente a proteínas específicas citoplasmáticas. As moléculas dos hormônios migram para o núcleo e mitocôndria onde interagem com receptores. No núcleo, a ligação dos hormônios tireoideanos inicia a transcrição de genes que exercem papéis fundamentais em vários processos celulares, como aqueles que codificam o hormônio de crescimento e a (Na^+–K^+)–ATPase. Na mitocôndria, os hormônios tireoideanos promovem o consumo de oxigênio e o aumento da oxidação dos ácidos graxos.

E. Fatores de crescimento

A sobrevivência dos organismos multicelulares necessita que a proliferação e a diferenciação celular seja rigorosamente controlada. As condições que regulam esses processos não estão ainda completamente esclarecidas. Entretanto, uma variedade de polipeptídeos e proteínas hormônios–like, denominados *fatores de crescimento* (ou *citocinas*), parecem regular o crescimento, a diferenciação e a proliferação de várias células. Muitas vezes, a ação de vários fatores de crescimento é necessária para promover respostas celulares. Os fatores de crescimento diferem dos hormônios por serem sintetizados em vários tipos de células e não somente nas células endócrinas. Exemplos de fatores de crescimento em mamíferos incluem o *fator de crescimento epidérmico* (EGF), *fator de crescimento derivado das plaquetas* (PDGF) e as somatomedinas. Moléculas similares como as interleucinas, que promovem a proliferação e diferenciação celular no sistema imune, também são consideradas citocinas. Várias moléculas supressoras do crescimento também foram caracterizadas. Os mecanismos pelos quais as citocinas exercem seus efeitos ainda são motivos de estudo. Alguns aspectos da ação das citocinas foram identificados e lembram aqueles observados para os hormônios.

1. Fator de crescimento epidermal (EGF). É um *mitógeno* (estimulador da divisão celular) para um grande número de células epiteliais, como as epidérmicas e de revestimento gastrointestinal. O EGF desencadeia a divisão celular quando se liga aos receptores EGF da membrana plasmática, que são tirosinas–cinases estruturalmente semelhantes aos receptores de insulina (*ver* acima).

2. Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). É secretado pelas plaquetas sangüíneas durante o processo de coagulação. Atuando com o EGF, o PDGF estimula o processo mitogênico nos fibroblastos e em outras células vizinhas durante a cura de ferimentos. O PDGF também promove a síntese de colágeno nos fibroblastos.

3. Somatomedinas. São polipeptídeos que mediam as ações promotoras de crescimento do GH (hormônio do crescimento). Produzidas no fígado e em outros órgãos (exemplo, músculo, fibroblasto, osso e rim) quando o GH se liga ao seu receptor na superfície celular, as somatomedinas estimulam o crescimento animal. As somatomedinas também promovem os mesmos processos metabólicos realizados pela insulina (exemplo, transporte de glicose e síntese de gorduras). Por essa razão, as duas somatomedinas encontradas em humanos são chamadas *fatores de crescimento I e II semelhantes à insulina* (IGF−I e IGF−II). Como outros fatores de crescimento polipeptídicos, as somatomedinas desencadeiam processos intracelulares pela ligação a receptores na superfície celular. Os receptores da somatomedina são tirosina−cinases.

4. Interleucina−2 (IL−2). É uma grupo de *citocinas* – pequenas proteínas liberadas por várias células do organismo, normalmente em resposta a um estímulo ativador – que regulam o sistema imune além de promover o crescimento e a diferenciação celular. A IL−2 é derivada de linfócitos T auxiliares que causa proliferação dos linfócitos T e linfócitos B ativados. As células são também estimuladas a produzir receptores de IL−2. A união da IL−2 aos receptores deflagra a divisão celular para a produção de numerosas células T idênticas. Esse processo, também como outros aspectos da resposta imune, continua até que o antígeno seja eliminado do corpo. O fármaco imunossupressor ciclosporina A inibe a produção de IL−2 suprimindo respostas indesejáveis, tais como a rejeição de enxertos.

5. Citocinas inibidoras do crescimento. Os *interferons* são uma classe de pequenas citocinas protéicas e glicoproteínas, produzidas pelas células T, pelos fibroblastos e por outras células em resposta a infecções virais e outros estímulos biológicos e sintéticos. Os interferons ligam-se a receptores específicos nas membranas celulares; seus efeitos consistem em indução de enzimas, supressão da proliferação celular, inibição da proliferação viral, intensificação da atividade fagocítica dos macrófagos e aumento da atividade citotóxica dos linfócitos T. Os interferons são divididos em cinco grandes classes (alfa, beta, gama, tau e ômega) e várias subclasses. Os *fatores de necrose tumoral* (TNF) são tóxicos para as células tumorais. Tanto o TNF−α (produzido pelos leucócitos fagocíticos antígeno−ativados) e o TNF−β (produzido por células T ativadas) suprimem a divisão celular. Também exercem vários papéis na regulação de vários processos de desenvolvimento.

12.3 Compartimentalização

Muitas vias anabólicas e catabólicas estão confinadas a diferentes compartimentos celulares. Nas células hepáticas, a biossíntese dos ácidos graxos a partir da acetil−CoA ocorre no citosol onde as enzimas para a biossíntese e para a geração de NADPH estão localizadas. A degradação dos ácidos graxos (β−oxidação) ocorre no interior da mitocôndria onde as enzimas apropriadas e os processos para a fosforilação oxidativa estão presentes. Assim, a biossíntese e a degradação dos ácidos graxos ocorrem em diferentes compartimentos.

A realização de reações em compartimentos específicos (matriz mitocondrial e citosol) requer mecanismos para transportar substâncias através das membranas. Os dois mecanismos principais de transporte são:

- *Sistemas de transporte.* Utilizam proteínas transportadoras específicas que medeiam os movimentos transmembrana entre a mitocôndria e citosol de pequenos íons inorgânicos, piruvato, carnitina/acil–carnitina, citrato, aspartato, malato, adenina nucleotídeo, citrulina e ornitina.
- *Sistemas de lançadeiras* (circuitos). Os grupos funcionais ou átomos em lugar de moléculas, atravessam a membrana. O grupo funcional é transferido para um composto que é transferido para outro compartimento, ex.: lançadeira malato–aspartato em que os elétrons do NADH citosólico são transportados para a mitocôndria.

Resumo

1. Os hormônios são moléculas que transferem informações entre as células. Para assegurar o controle do metabolismo, a síntese e a secreção da maioria dos hormônios nos mamíferos são regulados por um complexo mecanismo em cascata controlado pelo SNC. Além disso, o mecanismo de retro-alimentação negativa controla com precisão a síntese de vários hormônios.
2. Fatores de crescimento (ou citocinas) são polipeptídeos que regulam o crescimento, a diferenciação e proliferação celular. Eles diferem dos hormônios por serem produzidos por vários tipos de células em lugar de células glandulares especializadas.
3. Os hormônios e fatores de crescimento transmitem sinais regulatórios para as células–alvo por meio da ligação a receptores específicos. Hormônios solúveis em água tipicamente se ligam a receptores na superfície das células–alvo para produzir respostas no interior das células. Eles alteram a atividade de várias enzimas e/ou mecanismos de transporte.
4. Os segundos mensageiros AMPc, GMPc, IP_3, DAG e Ca^{2+} muitas vezes mediam a mensagem hormonal ou de fatores de crescimento.
5. O sistema de sinalização do AMPc consiste de um receptor, de uma proteína G, da adenilil-ciclase e de uma proteína–cinase dependente de AMPc.
6. No sistema do fosfoinositídeo, a ligação do hormônio provoca a hidrólise do fosfatidil–4,5–difosfato (PIP_2), produzindo inositol–1,4,5–trifosfato (IP_3), que abre canais de Ca^{2+}, e diacilglicerol (DG), que ativa a proteína–cinase C.
7. De modo geral, os hormônios da tireóide e esteróides hidrofóbicos ligam-se a receptores intracelulares. O complexo hormônio–receptor subsequentemente liga-se a segmentos específicos de DNA chamados elementos de resposta a um hormônio (HRE). A ligação de um complexo hormônio–receptor a um HRE aumenta ou diminui a expressão de genes específicos.
8. A insulina, sintetizada pelo pâncreas em resposta à glicose, liga-se ao receptor tirosina–cinase. A resposta celular à insulina é a captação de glicose e ácidos graxos.

Referências

BLACKSTOCK, J. C, **Biochemistry.** Oxford: Butterworth, 1998. p. 164-91.

CANTLEY, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science, 296:**1655-7, 2002.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica.** 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 269-96.

STRYER, L. **Bioquímica.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. p. 419-36.

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica.** Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 353-81.

Website: http://www.copewithcytokines.de/